

**Der letzte Biosyntheseschritt des
Nitritreduktasekofaktors Häm d_1 in
*Pseudomonas aeruginosa***

Von der der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

Von Julia Adamczack
Aus Braunschweig

1. Referentin: Professorin Dr. Gunhild Layer

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 21. Dezember 2016

mündliche Prüfung (Disputation) am: 18. Juni 2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorabveröffentlicht:

Publikationen:

Adamczack, J.; Hoffmann, M.; Papke, U.; Haufschildt, K.; Nicke, T.; Bröring, M.; Sezer, M.; Weimar, R.; Kuhlmann, U.; Hildebrandt, P.; Layer, G. (2014): NirN from *Pseudomonas aeruginosa* is a novel electron-bifurcating dehydrogenase catalyzing the last step of heme d_1 biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **289**, S. 30753–30762.

Nicke, T.; Schnitzer, T.; Munch, K.; Adamczack, J.; Haufschildt, K.; Buchmeier, S.; Kucklick, M.; Felgentrager, U.; Jansch, L.; Riedel, K.; Layer, G. (2013): Maturation of the cytochrome cd_1 nitrite reductase NirS from *Pseudomonas aeruginosa* requires transient interactions between the three proteins NirS, NirN and NirF. *Bioscience reports* **33**.

Tagungsbeiträge:

Adamczack, J., Layer, G.: Cofactor insertion into cytochrome cd_1 : The surprising role of the NirN Protein. Protrain (Prosthetic Groups: Transport and insertion) Retreat, Warberg, Deutschland (2015).

Adamczack, J., Hoffmann, M., Ulrich Papke, U., Bröring, M., Layer, G.: NirN from *Pseudomonas aeruginosa* is a Novel Electron-bifurcating Dehydrogenase Catalyzing the Last Step of Heme d_1 Biosynthesis. VAAM Jahrestagung, Dresden, Deutschland (2014).

Adamczack, J.: Heme d_1 – Transport and Insertion into Cytochrome cd_1 Nitrite reductase NirS in *Pseudomonas aeruginosa*. Tetrapyrrol Retreat, Technische Universität Braunschweig, Deutschland (2013).

Posterbeiträge:

Adamczack, J., Hoffmann, M., Papke, U., Bröring, M., Layer, G.: NirN from *Pseudomonas aeruginosa* is a Novel Electron-bifurcating Dehydrogenase Catalyzing the Last Step of Heme d_1 Biosynthesis. Mosbacher Kolloquium, Mosbach, Deutschland (2015).

Adamczack, J., Hoffmann, M., Ulrich Papke, U., Bröring, M., Layer, G.: NirN from *Pseudomonas aeruginosa* is a Novel Electron-bifurcating Dehydrogenase Catalyzing the Last Step of Heme d_1 Biosynthesis. VAAM Jahrestagung, Marburg, Deutschland (2015).

Adamczack, J., Hoffmann, M., Papke, U.; Sezer, M., Weimar, R., Kuhlmann, U., Kühner, M., Nicke, T., Hildebrandt, P., Layer, G.: Heme d_1 – Biosynthesis and Insertion into Cytochrome cd_1 Nitrite Reductase NirS in *Pseudomonas aeruginosa*. Gordon Research Conference (GRC) – Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, Salve Regina University, Newport, RI, USA (2014).

Adamczack, J., Nicke, T., Schnitzer, T., Layer, G.: Haem d_1 – Transport and insertion into cytochrome cd_1 nitrite reductase NirS in *Pseudomonas aeruginosa*. Tetrapyrrole Discussion Group (TPDG), University of Kent, Canterbury, GB (2013).

Adamczack, J., Nicke, T., Schnitzer, T., Buchmeier, S., Kucklick, M., Riedel, K., Jänsch, L., Layer, G.: Heme d_1 – Transport and insertion into cytochrome cd_1 nitrite reductase NirS in *Pseudomonas aeruginosa*. Mikrobiologie Retreat, Goslar, Deutschland (2013).

Nicke, T., Adamczack, J., Schnitzer, T., Buchmeier, S., Jänsch, L., Jockusch, B. M. & Layer, G.: Heme d_1 biosynthesis and insertion into cytochrome cd_1 nitrite reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. VAAM Jahrestagung, Bremen, Deutschland (2013).

“In reality, analytical minds are forever shooting wildly off in all directions simultaneously. It’s like joyously hitting jelly with a sledgehammer; like exploding galaxies; like a display of fireworks in which the pyrotechnic engineer has had a bit too much to drink and set off the whole conglobulation all at once.”

Alan Bradley

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Energiegewinnung mittels Denitrifikation	2
1.3 Die Cytochrom <i>cd₁</i> Nitritreduktase	6
1.4 Die Biosynthese des Kofaktors Häm <i>c</i>	8
1.4.1 Die Biosynthese von Uroporphyrinogen III und Häm <i>b</i>	9
1.4.2 Die Biosynthese und Insertion von Häm <i>c</i>	12
1.5 Der Kofaktor Häm <i>d₁</i>	13
1.6 Das <i>nir</i> Operon und die Häm <i>d₁</i> Biosynthese	15
1.6.1 NirE	17
1.6.2 NirDLGH	17
1.6.3 NirJ	18
1.7 Die letzten Schritte der Häm <i>d₁</i> Biosynthese	19
1.7.1 NirF	20
1.7.2 NirN	20
1.7.3 NirM und NirC	21
1.8 Zielsetzung	23
2 Materialien und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Geräte	25

2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Antikörper	27
2.1.3	Hilfsmittel	29
2.1.4	Stämme	30
2.1.5	Plasmide	31
2.1.6	Oligonukleotidprimer	32
2.1.7	Medien und Medienzusätze	33
2.2	Mikrobiologische Methoden	36
2.2.1	Sterilisation	36
2.2.2	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	36
2.2.3	Bestimmung der Zelldichte	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	37
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation	37
2.3.2	Kolonie PCR	39
2.3.3	Einführung von Punktmutationen und Deletionen mittels inverser PCR	39
2.3.4	DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen	40
2.3.5	Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose- Gelelektrophorese	40
2.3.6	DNA Konzentrationsbestimmung	41
2.3.7	Ligation von DNA	42
2.3.8	Herstellung von kompetenten Zellen	42
2.3.9	Transformation und Biparental Mating	43
2.3.10	Präparation von Plasmid-DNA	44
2.3.11	DNA-Sequenzierung	45
2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
2.4.1	Produktion von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i>	45

2.4.2	Anaerobe Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i>	46
2.4.3	Zellernte	46
2.4.4	Zellaufschluss zur Extraktion der Zielproteine	47
2.4.5	Periplasmaaufschluss.....	47
2.4.6	Strep-Tag-Affinitätschromatographie.....	48
2.4.7	Anionenaustauschchromatographie	49
2.4.8	Kationenaustauschchromatographie	51
2.4.9	Gelpermeationschromatographie	51
2.4.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	52
2.4.11	Konzentrieren und Pufferwechsel von Proteinlösungen	53
2.4.12	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.4.13	Westernblot.....	55
2.4.14	N-terminale Sequenzierung.....	57
2.4.15	Extraktion der Nitritreduktase Kofaktoren.....	57
2.4.16	Kofaktor Bindungsstudien	58
2.4.17	Anaerobe Arbeiten	59
2.4.18	Enzymaktivitätsassay für NirN.....	59
2.5	Spektroskopische Methoden.....	60
2.5.1	UV/Vis Spektroskopie.....	60
2.5.2	Resonanz-Raman-Spektroskopie.....	60
2.6	HPLC	60
2.7	Massenspektrometrie.....	61
2.8	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometrie (ICP-MS)	61
2.9	Protein Film Voltammetrie	62
2.10	Kristallisation von Proteinen.....	63

2.11	Bioinformatische Methoden.....	64
3	Ergebnisse und Diskussion	65
3.1	Komplementation von <i>P. aeruginosa</i> RM361	66
3.2	Kultivierung von <i>P. aeruginosa</i> zur Produktion der Nitritreduktase.....	67
3.3	Reinigung der nativen Nitritreduktase NirS aus <i>P. aeruginosa</i>	69
3.4	Spektroskopische Analyse der Nitritreduktasen aus <i>P. aeruginosa</i>	73
3.5	Resonanz Raman Spektroskopie der NirS Proteine	74
3.6	Charakterisierung der Nitritreduktase Kofaktoren.....	76
3.6.1	Extraktion der Kofaktoren	76
3.6.2	UV/Vis Spektroskopie der extrahierten Nitritreduktase Kofaktoren	77
3.6.3	Identifikation der Kofaktoren durch massenspektrometrische Analyse	78
3.6.4	HPLC Analyse der Nitritreduktase Kofaktoren	79
3.6.5	Bestimmung des Dihydrohäm d_1 Extinktionskoeffizienten	80
3.7	Bindung von Häm d_1 an NirN.....	81
3.8	NirN Aktivitätsassay mit Dihydrohäm d_1 als Substrat	82
3.9	Analyse des NirN Reaktionsprodukts	83
3.10	Transfer des NirN Reaktionsproduktes auf die semi apo NirS	84
3.11	NirN Aktivitätsassay unter Sauerstoffausschluss	85
3.12	Herstellung und Charakterisierung von NirN Varianten.....	87
3.12.1	Modellierung von NirN mit Häm d_1	87
3.12.2	Mutagenese des <i>nirN</i> Gens mittels Infusion Kit	89
3.12.3	Produktion und Reinigung von NirN Varianten	90
3.12.4	Enzymaktivität der NirN Varianten	91
3.12.5	Herstellung und Aktivitätsassay des NirN C-Terminus	94
3.13	Ermittlung von Redoxpotentialen	95

3.14	Kristallisation von NirN.....	99
3.15	Betrachtung zum Katalysemechanismus von NirN	100
3.16	Produktion und Reinigung von NirF aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> ..	100
3.17	Bindung von Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 an NirF	102
3.18	Kristallisation von NirF	103
3.19	Modellierung von NirF mit Häm d_1	104
3.20	Betrachtung zur Rolle von NirF	105
3.21	NirS Maturationsmodell in <i>P. aeruginosa</i>	107
4	Zusammenfassung	109
5	Summary	111
6	Ausblick.....	113
7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	133
	Danksagung.....	137

Abkürzungsverzeichnis

AB	autoinducer bioassay
Abb.	Abbildung
ad.	lat. zu
AK	Antikörper
ALA	5-Aminolävulinsäure
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
APB	Alkalische Phosphatase Puffer
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintrisphosphat
Bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indocylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CIP	engl. <i>clean in place</i>
Cm	Chloramphenicol
Cm ^r	Chloramphenicol-Resistenz
d_1	Häm d_1
Da	Dalton
dd_1	Dihydrohäm d_1
Δ	Deletion
ΔF	Deletion des <i>nirF</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
ΔN	Deletion des <i>nirN</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
ΔS	Deletion des <i>nirS</i> -Gens in <i>P. aeruginosa</i> PAO1
<i>D.s.</i>	<i>Dinoroseobacter shibae</i>

dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
ds	Doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	engl. <i>electron paramagnetic resonance</i>
et al.	lat. <i>et alii</i>
fw.	engl. <i>forward</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
HABA	2-(4-Hydroxy-benzenazo)-benzoesäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
ICP-MS	engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometrie</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
GPC	Gelpermeationschromatographie
kb	Kilobasenpaar (1 kb = 1000 bp)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 Da)
LB	Luria Bertani
LTQ	Lysin Tyrosylquinon
Mbp	Megabasenpaare (1 Mbp = 1000000 bp)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
M _r	relative molekulare Masse
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i>
OD	Optische Dichte
<i>p.a.</i>	lat. <i>pro analysi</i>

<i>P.a.</i>	<i>P. aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PCS	engl. <i>Prescission cleavage site</i>
p.s.i.	engl. <i>pounds per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	engl. <i>reverse</i>
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
s.a.	semi apo Nitritreduktase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
SUMT	SAM-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Tab.	Tabelle
TB	engl. <i>terrific broth</i>
TMM	engl. <i>trace metal mixture</i> ; Spurenelementlösung
TPQ	2,4,5-Trihydroxyphenylalaninquinon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp
w/v	engl. <i>weight per volume</i> ; Masse pro Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
ZYM	engl. <i>Z-Amine Yeast Medium</i>

1 Einleitung

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist einer der am weitesten verbreiteten Krankenhauskeime (Hidron *et al.*, 2008). Als opportunistisches Pathogen befällt *P. aeruginosa* Patienten mit geschwächtem Immunsystem. Das Bakterium ist unter anderem Auslöser von Augen- und Haut-, sowie Harnwegs- und Atemwegsinfektionen. Bei an zystischer Fibrose erkrankten Patienten nimmt *P. aeruginosa* eine besondere Rolle ein. Das Bakterium kann – gemeinsam mit anderen Krankheitserregern – das Sekret der Lunge als Medium nutzen und somit langwierige Lungenentzündungen auslösen (Giwerzman *et al.*, 1990). Verschiedene Eigenschaften begünstigen den Erfolg von *P. aeruginosa* als allgegenwärtiger Organismus und Pathogen (Gellatly & Hancock, 2013).

Bereits 1859 isolierte Joseph-Maurin Fordos ein Pigment, welches er Pyocyanin nannte, aus blau-grün verfärbten Wundverbänden (Fordos, 1859). Schröter entdeckte 1872 ein Bakterium, welches er als *Bakterium aeruginosum* benannte, bezugnehmend auf den lateinischen Begriff "aerugo" für Grünspan (Schröter, 1872). *Bakterium aeruginosum* wurde durch Gessard als die Quelle von Pyocyanin identifiziert (Gessard, 1882). Erst Migula prägte den Namen "*Pseudomonas aeruginosa*" durch die Einordnung des Bakteriums in die Gattung der Pseudomonaden (Migula, 1900). Noch heute ist die Fähigkeit, Pigmente zu produzieren, ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für *P. aeruginosa*. Es dauerte 100 Jahre, bis das komplette Genom des Bakteriums entschlüsselt werden konnte (Stover *et al.*, 2000).

P. aeruginosa ist ein gram-negatives, 1,5-3 µm langes, stäbchenförmiges Bakterium (Abb. 1.1 A). Sein Genom umfasst 6,3 Mbp. Es ist ein fakultativer Anaerobier und kann in Abwesenheit von Sauerstoff beispielsweise Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor im Rahmen der Denitrifikation nutzen (Zumft, 1997). Weiterhin ist das Bakterium zur Fermentation von Arginin und Pyruvat befähigt (Vander Wauven *et al.*, 1984; Eschbach *et al.*, 2004). Der metabolisch vielfältige Organismus kann in Böden und Gewässern wachsen, jedoch auch auf künstlichen Oberflächen, wie Kathetern und Implantaten, überleben. Durch β -Lactamasen und *Multidrug* Effluxpumpen wie MexB (Abb. 1.1 C) besitzt *P.*

aeruginosa eine hohe intrinsische Antibiotikateranz (Winsor *et al.*, 2011; Schweizer, 2003; Li *et al.*, 1995). Es entwickelt außerdem zügig Antibiotikaresistenzen (Oliver *et al.*, 2000) und weist eine geringe Durchlässigkeit der äußeren Membran auf (Wang *et al.*, 2003). Bei der Infektion ist das Bakterium erfolgreich, da es in der Lage ist, mittels Alginateproduktion Biofilme auszubilden, wodurch es schwer zu behandeln ist (May *et al.*, 1991, Costerton *et al.*, 1999). *P. aeruginosa* besitzt eine einzige polare Flagelle und ist daher motil (O'Toole & Kolter, 1998). Neben Pyocyanin (Abb. 1.1 B) bildet das Bakterium weitere wasserlösliche Pigmente wie Pyoverdine oder 1-Hydroxyphenazine. Diese Pigmente sind am Quorum Sensing, der Virulenz und der Eisenaufnahme von *P. aeruginosa* beteiligt (Dietrich *et al.*, 2006, Meyer *et al.*, 1996 Cox & Adams, 1985). Der charakteristisch fruchtig-süßliche Geruch des Bakteriums entsteht durch die Synthese von 2-Aminoacetophenon (Mann, 1966).

Auch durch die Verfügbarkeit gentechnischer Werkzeuge ist *P. aeruginosa* ein Modellorganismus für denitrifizierende Organismen und ein eingehend erforschter Erreger nosokomialer Infektionen.

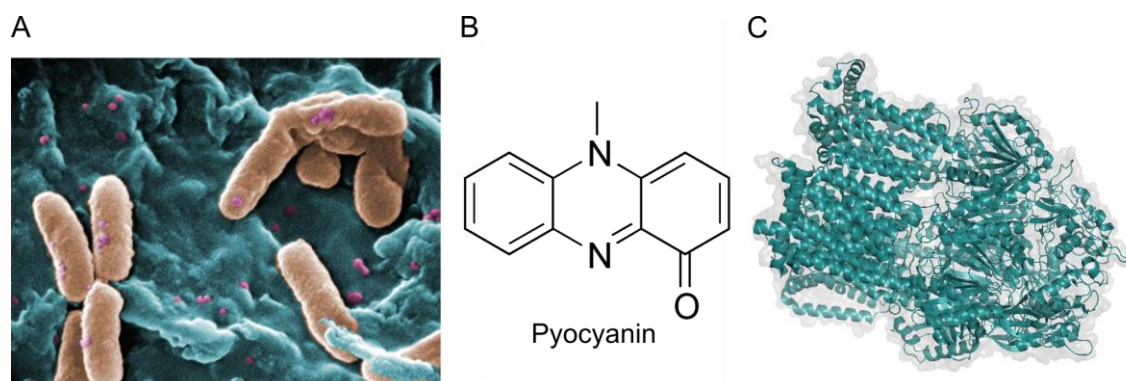


Abb. 1.1: *P. aeruginosa*, Pyocyanin und MexB. **A** Die Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P. aeruginosa* zeigt das stäbchenförmige Bakterium (CDC / Janice Haney Carr). **B** Struktur des Pigments Pyocyanin, der grün-blaue Farbstoff von *P. aeruginosa* **C** Die Kristallstruktur des *Multidrug* Exporters MexB (Sennhauser *et al.*, 2009).

1.2 Energiegewinnung mittels Denitrifikation

Die Denitrifikation ist ein Teil des globalen Stickstoffkreislaufs, bei der zuvor in Form von Stickoxiden fixierter molekularer Stickstoff wieder in die Atmosphäre zurückgeführt wird. Zur Denitrifikation befähigte Bakterien nutzen dabei Stickoxide als terminale Elektronenakzeptoren und gewinnen Energie durch den Aufbau eines Protonengradienten über die Cytoplasmamembran (Jones *et al.*, 1980). Die Denitrifikation erfolgt in vier Schritten: Nitrat wird über Nitrit,

Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff reduziert. Für jeden dieser Schritte sind Enzyme mit Metallzentren zuständig (Abb. 1.2).

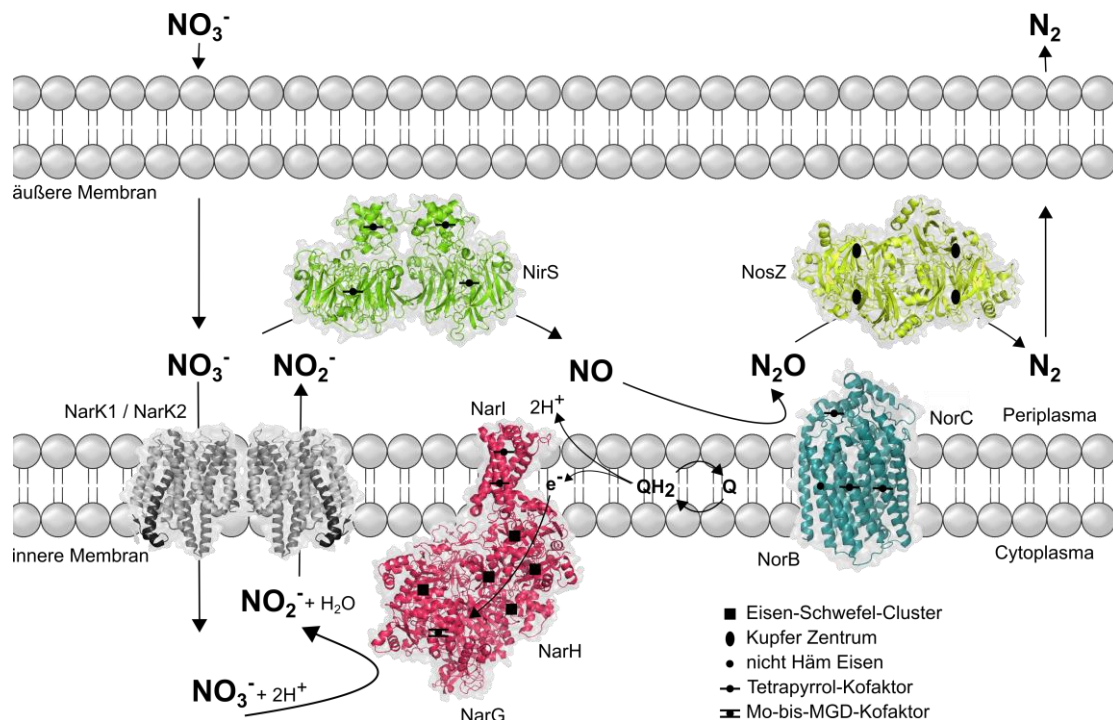


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der vier Schritte der Denitrifikation in *P. aeruginosa* (nach Zumft, 1997). Durch das Nitrat/Nitrit Antiporter System NarK1/NarK2 gelangt Nitrat in das Cytoplasma, wo es durch die Nitratreduktase zu Nitrit umgesetzt wird. Die Elektronen für diese Reaktion gelangen aus dem Quinol-Pool (Q) über die NarL Untereinheit in die Nitratreduktase. Nitrit wird in das Periplasma exportiert und durch die Nitritreduktase zu Stickstoffmonoxid reduziert. Im Anschluss erfolgt die Umsetzung von NO zu Distickstoffmonoxid durch die membranständige NO-Reduktase. Im letzten Schritt der Denitrifikation wird Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff umgewandelt, welcher in die Atmosphäre zurückgeführt wird. Die an den Reaktionen und dem Elektronentransport beteiligten Kofaktoren sind symbolisch dargestellt. (Protein Data Bank Nr.:1Q16 (Nitratreduktase), 4JRE (Nitrat/Nitrit Antiporter); 1NIR (Nitritreduktase); 3OOR (Stickstoffmonoxidreduktase); 3SBP (Distickstoffmonoxid Reduktase)).

Der erste Schritt der Denitrifikation, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit, wird durch die Nitratreduktase katalysiert. Bei Prokaryoten sind zwei Typen von dissimilatorischen Nitratreduktasen bekannt: die membrangebundene NAR und die periplasmatische NAP. Beide Enzyme gehören zur Dimethylsulfoxid (DMSO)-Reduktasefamilie und enthalten Molybdän-Kofaktoren, sowie weitere redoxaktive Kofaktoren. Die NAR ist bei *P. aeruginosa* im *narK1K2GHJ* Operon codiert und setzt sich aus den NarG, NarH Untereinheiten sowie der Transmembran-untereinheit NarL zusammen (Williams *et al.*, 2007; Philippot & Hoyberg, 1999). NarG enthält den Molybdopterin-guanin-dinukleotid (Mo-bis-MGD) Kofaktor und somit das aktive Zentrum für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. NarG enthält außerdem ein elektronenübertragendes [4Fe-4S] Cluster. NarH bindet drei [4Fe-

4S] Cluster und ein [3Fe-4S] Cluster. NarGH befinden sich im Cytoplasma und werden durch NarI in der Membran verankert, welches seinerseits zwei Häm *b*-Kofaktoren trägt. Elektronen aus dem *Quinol*-Pool können über NarI in das Enzym eintreten und dienen letztlich der Reduktion von Nitrat (Bertero *et al.*, 2003). Dabei wird ein Protonengradient erzeugt, da im Periplasma zwei Protonen frei werden, jedoch auch zwei Protonen im Cytoplasma in Form von Wasser gebunden werden.

Die periplasmatische NAP konnte ebenfalls bei *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Das NAP Enzym besteht aus den Untereinheiten NapA und NapB, welche im *napEFDABC* Operon codiert sind (Williams *et al.*, 2007). Ähnlich zu NarG enthält die periplasmatische Nitratreduktase einen Mo-bis-MGD-Kofaktor in der NapA Untereinheit (Potter *et al.*, 2001). Durch ihre periplasmatische Lokalisation kann sie jedoch nicht zur Ausbildung eines Protonengradienten beitragen. Ihre physiologische Funktion ist daher ungeklärt (Van Alst *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2004).

Der Schlüsselschritt der Denitrifikation, die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid wird durch die periplasmatische Nitritreduktase katalysiert. In diesem Schritt entsteht das erste gasförmige Intermediat der Denitrifikation. Man unterscheidet dabei zwischen dem Kupfer-Enzym CuNiR und der Häm-enthaltenden Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase. Die kupferhaltige Nitritreduktase ist ein Homotrimer aus 40 kDa Untereinheiten und bindet sowohl ein Typ 1 als auch ein Typ 2 Kupfer Zentrum (Zumft, 1997; Adman *et al.*, 1995).

In *P. aeruginosa* konnte die Häm-haltige Nitritreduktase nachgewiesen werden. Die Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase ist ein Homodimer aus 60 kDa Untereinheiten. Jede der Untereinheiten enthält je ein Häm *c* sowie ein Häm *d₁*, welches das aktive Zentrum der Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid darstellt (Nurizzo *et al.*, 1997). Sie ist Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit und wird in Kapitel 1.3 genauer behandelt.

Der dritte Schritt der Denitrifikation beinhaltet die Bildung der Bindung zwischen zwei Stickstoffatomen. Dies findet während der Reduktion von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid statt. Für diesen Schritt ist in *P. aeruginosa* die membrangebundene cNOR zuständig. cNOR ist ein Heterodimer aus den

Untereinheiten NorB und NorC. NorB enthält zwei Häm *b* Kofaktoren und ein nicht-Häm-Eisen (Timoteo *et al.*, 2011). NorC enthält ein Häm *c*. Dieses ist zur periplasmatischen Seite exponiert und in der Lage, Elektronen auf NorB zu übertragen. Das aktive Zentrum in NorB besteht aus einem Häm *b* und einem nicht-Häm-Eisen, welches durch drei Histidin-Seitenketten koordiniert wird (Hino *et al.*, 2010 und Cordas *et al.*, 2013). Der katalytische Mechanismus konnte bislang nicht abschließend geklärt werden.

Der letzte Schritt der Denitrifikation wird durch die Distickstoffmonoxid Reduktase NosZ in *P. aeruginosa* katalysiert. Dabei entsteht molekularer Stickstoff, der somit wieder in die Atmosphäre zurückgeführt wird. Auch die NosZ ist im Periplasma lokalisiert und ist im *nosRZDFYL* Operon kodiert. Jedes der zwei NosZ Monomere enthält je ein Cu_A und ein Cu_Z Zentrum, bestehend aus 2 beziehungsweise 4 Kupferatomen. Das Cu_Z Zentrum ist dabei das aktive Zentrum der Reduktion, dem Cu_A Zentrum wird eine elektronenübertragende Funktion zugeschrieben (Brown *et al.*, 2001). Bei NosR handelt es sich um ein Regulatorprotein, die Funktionen von NosDFYL sind nicht abschließend geklärt, sie könnten jedoch an der Biogenese der Kupferzentren beteiligt sein (Zumft & Kroneck, 2007).

Nitrat ist in der Umwelt vorhanden, jedoch wird es durch die Nitratreduktase im Cytoplasma zu Nitrit umgesetzt. Nitrit wiederum muss in das Periplasma gelangen, um dort zu NO reduziert werden zu können. Es müssen daher Nitrat- sowie Nitrittransportsysteme vorhanden sein, um die Verfügbarkeit der Elektronenakzeptoren zu gewährleisten. Die Nitrattransporter NarK1 und NarK2 sind zusätzlich zur Nitratreduktase im *narK1K2GHJ* Operon kodiert. In *P. aeruginosa* scheint NarK2 der eigentlich essentielle Nitrat/Nitrit Transporter zu sein (Goddard *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2006).

Bei der Regulation des Denitrifikations-Stoffwechselweges in *P. aeruginosa* spielen sowohl die Abwesenheit von Sauerstoff, als auch die Anwesenheit von Nitrat eine Rolle. Der Regulator ANR (*a*naerobic *r*egulation of *a*rginine *d*eiminase and *n*itrate *r*eduction) besitzt ein [4Fe-4S] Cluster, welches in Anwesenheit von Sauerstoff instabil ist (Zimmermann *et al.*, 1991). Bei Abwesenheit von Sauerstoff aktiviert ANR unter anderem das Zweikomponentensystem NarXL, welches auf Nitratanwesenheit reagiert. NarXL kann seinerseits unter anderem die

Produktion von DNR (*d*issimilatory nitrate respiration regulator) aktivieren, welches in seiner Stickstoffmonoxid-gebundenen Form die Transkription der Denitrifikationsgene aktiviert (Schreiber *et al.*, 2007; Arai *et al.*, 2003). Auch Zell-Zell Kommunikation spielt bei der Regulation der Denitrifikation eine Rolle (Toyofuku *et al.*, 2012b).

1.3 Die Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase

In *P. aeruginosa* ist die Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase NirS verantwortlich für die Umsetzung von Nitrit zu NO und somit den zweiten Schritt der Denitrifikation. Wie bereits in Kapitel 1.2 angedeutet, handelt es sich bei der NirS um ein periplasmatisches Enzym. Die NirS ist ein Homodimer aus 60 kDa Untereinheiten. Jedes Monomer trägt je einen kovalent gebundenen Häm *c* und einen nicht-kovalent gebundenen Häm *d*₁ Kofaktor (Kuronen *et al.*, 1972). Häm *d*₁ stellt auch das aktive Zentrum für die Reduktion von Nitrit zu NO dar. Neben der Reduktion von Nitrit ist das Enzym auch in der Lage, die 4-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser zu vollziehen (Nurizzo *et al.*, 1997)

1961 beschrieben Horio *et al.* zum ersten Mal die Reinigung eines Proteins, welches sie als Cytochromoxidase bezeichneten. Das Protein war in der Lage, Cytochrom *c*₅₅₁ und Azurin zu oxidieren. Es wies außerdem die spektralen Eigenschaften eines *c*-Typ Cytochroms auf, zeigte jedoch auch ein weiteres Absorptionssignal im Bereich von 645 nm. Die Cytochromoxidase-Aktivität des Enzyms wurde darüberhinaus durch Kohlenmonoxid und Cyanid gehemmt. Dies ließ die Autoren vermuten, dass das Protein zwei unterschiedliche Häm-Kofaktoren tragen könnte. Ein derartiges Enzym konnte auch in vielen anderen Bakterien nachgewiesen werden. Schon 1960 hatten Yamanaka *et al.* für die Cytochromoxidase eine Nitritreduktase-Aktivität zeigen können, daher wurde 1964 der Begriff Nitritreduktase für das Enzym gebräuchlich (Yamanaka *et al.*, 1964). Der zweite Häm-Kofaktor der Cytochromoxidase wurde durch Lemberg & Barret 1972 als Häm *d*₁ klassifiziert. Das Protokoll für die Reinigung des Enzyms wurde im Laufe der Jahre verbessert und verändert und damit auch die Ausbeute des Enzyms erhöht (Parr *et al.*, 1976). Jedoch konnte die Kristallstruktur der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase aus *P. aeruginosa* erst 1997 durch die Arbeiten von Nurizzo *et al.* mit einer Auflösung von 2,15 Å gelöst werden (Abb. 1.3).

Wie anhand der Kristallstruktur der NirS zu erkennen war, lässt sich das Enzym in eine N-terminale Häm *c* bindende Domäne und eine C-terminale Häm *d₁* bindende Domäne aufteilen. Ein N-terminaler Arm reicht bis in das jeweils andere Monomer, über die Dimer-Kontaktstelle hinaus. Der Häm *c* Kofaktor wird durch eine typische Klasse I Cytochrom *c* Faltung gebunden. Es ist über die Cysteine 47 und 50 kovalent mit dem Protein verknüpft. Das zentrale Eisen wird durch His51 und Met88 koordiniert. Die beiden Domänen werden durch einen langen Linker miteinander verknüpft. Die Häm *d₁* enthaltende Domäne bindet ihren Kofaktor innerhalb einer 8-blättrigen β -Propeller Domäne. Das Eisen des Häm *d₁* wird proximal durch das Histidin an Position 182 koordiniert. Distal wird das Häm *d₁* indirekt über ein Wassermolekül oder Hydroxidion durch Tyr10 aus dem jeweils anderen Monomer kontaktiert (Nurizzo *et al.*, 1997).

Die Maturation der Nitritreduktase NirS erfordert somit den Einbau beider Kofaktoren. Das Häm *c* wird mittels der Cytochrom *c* Maturationsmaschinerie aus Häm *b* hergestellt und kovalent mit dem Enzym verknüpft. Die Cytochrom *c* Maturationsmaschinerie ist Gegenstand von Kapitel 1.4.3.

Wie die anderen Enzyme der Denitrifikation ist auch die NirS in einem Operon, *nirSMCFDLGHJEN*, codiert. Dieses enthält neben dem strukturellen Gen der NirS auch die Gene der potentiellen Elektronendonatoren NirM und NirC. Außerdem sind im sogenannten *nir* Operon auch die Enzyme für die Biosynthese des Häm *d₁* codiert. Kawaski *et. al.* identifizierten 1997 die Genprodukte von *nirFDLGHJ* und *E* als notwendig für die Häm *d₁* Biosynthese. Das *nir* Operon enthält jedoch auch ein weiteres Gen, *nirN*, dessen Produkt bis zu dieser Arbeit keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden konnte.

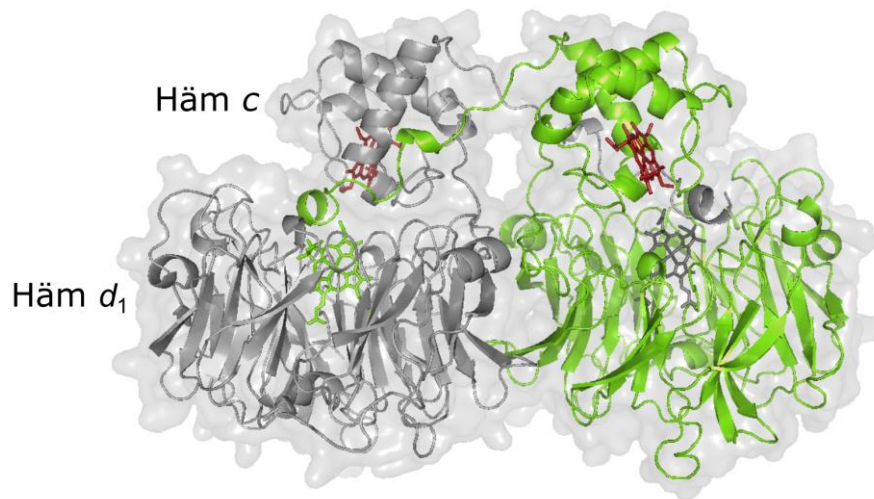


Abb. 1.3: Kristallstruktur der Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa* (Nurizzo *et al.*, 1997). Die Nitritreduktase ist ein Homodimer aus 60 kDa Untereinheiten (in grau und grün dargestellt). Jedes Monomer enthält einen Häm *c* Kofaktor (rot) in seiner N-terminalen Dömane. Jeweils ein Häm *d*₁ Kofaktor befindet sich in den C-terminalen Domänen der Monomere (grün/grau). Jedes Monomer kann in mehrere Segmente unterteilt werden: einen N-terminalen Arm, der bis in das jeweils andere Monomer reicht, eine Domäne, die den Häm *c* Kofaktor trägt, einen langen Linker, der die Häm *c* und Häm *d*₁ Domänen miteinander verbindet, sowie die Häm *d*₁ Domäne, welche die Struktur eines β -Propellers aufweist.

1.4 Die Biosynthese des Kofaktors Häm *c*

Beide Kofaktoren der Nitritreduktase sind Tetrapyrrole. Bei Tetrapyrrolen handelt es sich um zyklische oder lineare Moleküle, die vier Pyrrolringe enthalten. Jeder Pyrrolring enthält jeweils ein Stickstoffatom. Die Ringe sind entweder direkt kovalent verknüpft oder mit Kohlenstoffbrücken miteinander verbunden. Viele Tetrapyrrole chelatieren Metallionen wie Magnesium, Eisen oder Nickel. Die Redox Eigenschaften der Metallionen werden so kontrolliert und für mannigfaltige biochemische Reaktionen eingesetzt (Heinemann *et al.*, 2008). Sie bilden daher neben Eisen-Schwefelclustern, Molybdänkofaktoren und weiteren Metallzentren die Zentren für Elektronenübertragungen und enzymatische Reaktionen. Bekannte Vertreter der Tetrapyrrole sind das eisenhaltige Häm im Hämoglobin des Blutes, das magnesiumhaltige Chlorophyll der Pflanzen und Cyanobakterien oder auch der Kofaktor F₄₃₀, der Nickel chelatiert und bei der Methanogenese zum Einsatz kommt (Warren & Smith, 2010).

Bei dem in der Nitritreduktase für den Elektronentransport zuständigen Kofaktor handelt es sich um das Tetrapyrrol Häm *c*, welches in mehreren Biosyntheseschritten über Uroporphyrinogen III (UROGEN) und Häm *b* aus 5-Aminolävulinsäure (ALA) hergestellt wird. ALA ist der gemeinsame Vorläufer der

verschiedenen Tetrapyrrole und kann abhängig vom Organismus auf zwei verschiedene Arten hergestellt werden.

1.4.1 Die Biosynthese von Uroporphyrinogen III und Häm *b*

Mittels des sogenannten Shemin-Biosynthesewegs kann ALA in einer Kondensationsreaktion aus Succinyl-CoA und Glycin entstehen (Shemin & Rittenberg, 1945). Diese Reaktion wird durch die 5-Aminolävulinsäure Synthase katalysiert (Warnick & Burnham, 1971). Der Shemin-Weg wird bei Säugern, α -Proteobakterien und Pilzen gefunden. Alternativ dazu kann ALA aus Glutamyl-tRNA im Rahmen des C5-Biosynthesewegs synthetisiert werden. Dabei wird Glutamyl-tRNA durch die Glutamyl-tRNA Synthetase hergestellt. Es folgt die NADPH abhängige Umsetzung zu Glutamat-1-Semialdehyd durch die Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR). Glutamat-1-Semialdehyd wird in einem letzten Schritt durch die Glutamat-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase (GSAM) zu ALA umgesetzt. Pflanzen, Archaea und die meisten Bakterien nutzen den C5-Weg, um ALA herzustellen. (Beale *et al.*, 1975).

Wie in Abb 1.4 dargestellt, wird nun in den nächsten drei Schritten der Hämbiosynthese der Vorläufer Uroporphyrinogen III synthetisiert. Durch die Porphobilinogen Synthase HemB entsteht zunächst unter asymmetrischer Kondensation aus zwei ALA Molekülen Porphobilinogen (PBG) (Frankenberg *et al.*, 1999). Die PBG-Deaminase HemC ist im folgenden Schritt in der Lage, aus 4 Molekülen PBG prä-Uroporphyrinogen zu bilden (Louie *et al.*, 1996). Die Uroporphyrinogen III Synthase HemD katalysiert schließlich die Herstellung von Uroporphyrinogen III durch eine Inversion des D-Rings und den Ringschluss des Tetrapyrrols (Silva und Ramos, 2008).

In vier weiteren enzymkatalysierten Schritten wird aus Uroporphyrinogen III Häm gebildet. UROGEN wird im ersten Schritt durch die UROGEN Decarboxylase HemE zu Coproporphyrinogen III decarboxyliert (Whitby *et al.*, 1998). Dabei werden alle Acetatseitenketten von UROGEN zu Methylgruppen umgesetzt. Aus Coproporphyrinogen III entsteht im nächsten Schritt Protoporphyrinogen IX, indem die Propionatgruppen an Ring A und B zu Vinylgruppen umgesetzt werden. Unter anaeroben Bedingungen wird dieser Schritt durch das Radical SAM Enzym Coproporphyrinogen III Dehydrogenase (HemN) katalysiert (Layer *et al.*, 2003). Aerob ist das sauerstoffabhängige Enzym HemF in der Lage, die

Herstellung von Protoporphyrinogen IX zu katalysieren (Breckau *et al.*, 2003). Durch die Protoporphyrinogen IX Oxidasen HemY (sauerstoffabhängig) oder HemG (sauerstoffunabhängig) wird durch Abstraktion von sechs Elektronen Protoporphyrin IX erzeugt, welches das vollendete, vollständig konjugierte Porphyrinringsystem besitzt (Koch *et al.*, 2004; Möbius *et al.*, 2010). Im letzten Schritt der Hämbiosynthese wird Eisen mittels der Ferrochelatase HemH in das Tetrapyrrol inkorporiert (Dailey und Dailey 2002).

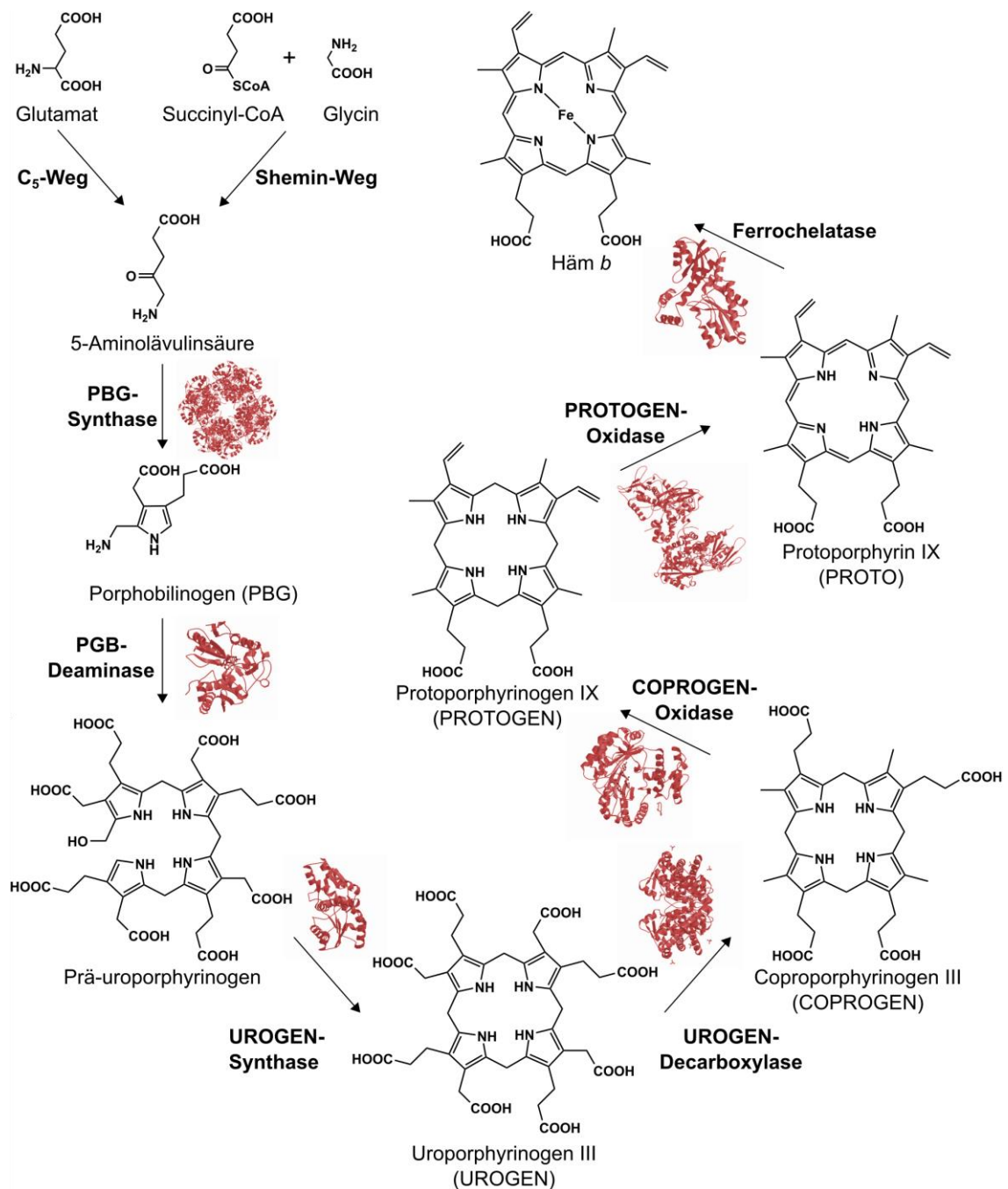


Abb. 1.4: Die Uroporphyrinogen III- und Hämbiosynthese und deren Intermediate (verändert nach Layer *et al.*, 2010). Die einzelnen Schritte der Herstellung von 5-Aminolävulinsäure über den C₅- oder Shemin-Weg und deren Umsetzung zu Uroporphyrinogen III als gemeinsamen Tetrapyrrolvorläufer sind dargestellt. Weiterhin ist die Biosynthese von Häm *b* aus Uroporphyrinogen III in vier Schritten gezeigt. Das für den jeweiligen Schritt verantwortliche Enzym ist als Kristallstruktur aus unterschiedlichen Organismen beispielhaft dargestellt (Protein Data Bank Nr.: 1B4K (PBG Synthase), 1GTK (PBG Deaminase), 1JR2 (UROGEN Synthase), 1J93 (UROGEN Decarboxylase) 1OLT (COPROGEN Oxidase), 1SEZ (PROTOGEN Oxidase), 1AK1 (Ferrochelatase)). Für die Synthesen von Protoporphyrinogen IX und Protoporphyrin IX können jeweils sauerstoffabhängige oder sauerstoffunabhängige Enzyme verantwortlich sein.

1.4.2 Die Biosynthese und Insertion von Häm c

Die Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase enthält, wie bereits in Kapitel 1.3 angesprochen, neben dem Häm *d₁* ein kovalent gebundenes Häm *c*, welches durch ein spezifisches Maturationssystem in das Apoprotein inseriert wird. Wie bei vielen anderen gram-negativen Bakterien erfolgt die Maturation von *c*-Typ Cytochromen bei *P. aeruginosa* durch das sogenannte Cytochrom c-Maturations System I (Ccm), codiert durch *ccmABCDEFGH* (Thöny-Meyer, 2002). *c*-Typ Cytochrome weisen ein charakteristisches -CXXCH- Motiv auf, dessen Cysteinreste immer kovalent mit den 2- und 4-Vinylgruppen von Häm *b* verknüpft werden (Stevens *et al.*, 2004), sodass das resultierende Häm *c* über Thioetherbrücken im Protein gebunden vorliegt. Cytochrome werden nach der Translation über das Sec-Export-System in das Periplasma exportiert. Erst dort erfolgt die Verknüpfung des Häm *b* mit dem Protein.

Das Ccm System ist ein Komplex aus transmembran- und membranverankerten Proteinen und ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert (Abb. 1.5). Alle Proteine dieses Komplexes, sowie das Protein DsbD sind essentiell für die Maturation der *c*-Typ Cytochrome (Stevens *et al.*, 2011). Jedoch konnten bislang nicht alle Schritte des Transports des Kofaktors, sowie die Interaktion der Ccm Proteine untereinander und zuletzt die Verknüpfung des Häm *b* mit dem Apocytochrom aufgeklärt werden. Wahrscheinlich sind die drei Proteine CcmABC am Transport von Häm *b* aus dem Cytoplasma in das Periplasma unter ATP-Verbrauch beteiligt und leiten den Kofaktor an das Häm Chaperon CcmE weiter (Sawyer & Barker, 2012). Dieses bindet Häm *b* kovalent (Lee *et al.*, 2005). CcmD ist an der Freisetzung des Häm-beladenen CcmE Proteins aus dem CcmABCDE Komplex beteiligt (Richard-Fogal *et al.*, 2008). Die C-terminale Domäne von CcmH ist im Periplasma für die Interaktion der Ccm-Maschinerie mit dem Apocytochrom verantwortlich. Außerdem wird vermutet, dass CcmF die Interaktion von CcmE, welches Häm *b* bindet und CcmH, welches das Apocytochrom bindet, ermöglicht, sodass Häm in das Apocytochrom inkorporiert werden kann (Stevens *et al.*, 2011).

Da sich zwischen den Cysteinen des -CXXCH- Motivs des Apocytochroms in der oxidierenden Umgebung des Periplasmas Disulfidbrücken bilden können, ist es nötig, dass diese vor dem Einbau des Häm *c* Kofaktors in das Protein reduziert

werden (Shouldice *et al.*, 2011). DsbD, CcmG und die N-terminale Domäne von CcmH sind an der Reduktion der Cysteine des Apoproteins beteiligt.

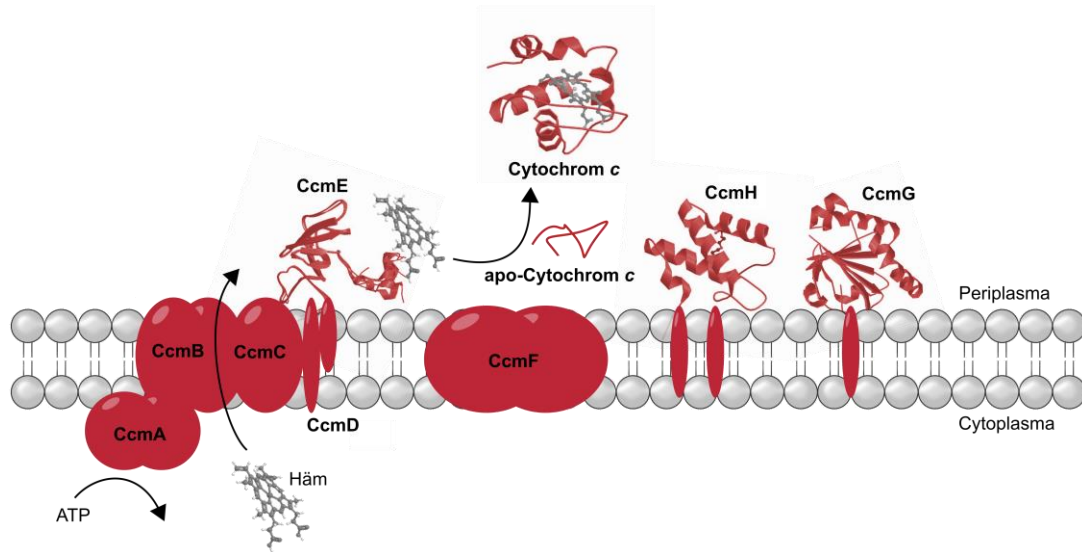


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Cytochrom c Maturationsmaschinerie (verändert nach Stevens *et al.*, 2011). Der Komplex aus CcmABCDE ist für die Bindung von Häm *b* im Cytoplasma, den Transport über die Membran und die Freisetzung im Periplasma zuständig. Wie dieser Transport erfolgt, ist bislang ungeklärt. CcmH und CcmG binden die Apocytochrome und reduzieren die Cysteine des -CXXCH-Motivs. (Protein Data Bank Nr.: 1SR3 (CcmE), 2B1K (CcmG), 2HL7 (CcmH), 351C (Cytochrom *c*)).

1.5 Der Kofaktor Häm d_1

Häm d_1 wurde zuerst durch Horio *et al.* 1961 isoliert. Die spektralen Eigenschaften von Häm d_1 in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden durch Walsh *et al.* 1981 untersucht. Die Substituenten des Isobakteriochlorins konnten durch Timkovich *et al.* 1984 identifiziert werden. Chang *et al.* schlugen 1985 aufgrund der experimentellen Daten vor, dass es sich bei Häm d_1 um ein Dioxoisobakteriochlorin handeln könnte. Tatsächlich wurde die Struktur von Häm d_1 anhand der chemischen Synthese durch Wu & Chang (1987) und Micklefield *et al.* (1993) bestätigt. Die Synthese zeigte außerdem die Möglichkeit auf, dass Häm d_1 biosynthetisch mit Sirohäm und Kofaktor F₄₃₀ verwandt sein könnte.

Die Struktur des Häm d_1 ist in Abbildung 1.6 dargestellt, sie weist einige Besonderheiten auf. Es trägt elektronenziehende Carbonylgruppen an C3 und C8. Die Positionen C2 und C7 tragen Acetatseitenketten und Methylgruppen. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die mit dem Rest des Ringsystems konjugierte Acrylatseitenkette an C17 des D Rings. Die Umwandlung der Propionatseitenkette eines Häm d_1 Vorläufermoleküls in diese Acrylatseitenkette im Rahmen der Häm d_1 Biosynthese ist Thema dieser Dissertation.

Der Kofaktor Häm d_1 ist einzigartig, da er nur innerhalb der Cytochrom cd_1 Nitritreduktase als Teil des Denitrifikationsprozesses biologische Anwendung findet (Zumft, 1997). Reduziertes Häm d_1 (Fe(II)) weist im Gegensatz zu Häm eine höhere Affinität zu Nitrit als zu NO auf. Diese Eigenschaft begünstigt die zügige Freisetzung des Produkts Stickstoffmonoxid (Allen *et al.*, 2005). Es wurde daher vorgeschlagen, dass Nitrit erst an die Nitritreduktase bindet, wenn beide Häm-Zentren reduziert vorliegen. Das erste Elektron wird dann genutzt, um Nitrit zu NO zu reduzieren. Das zweite Elektron kann von dem Häm c Kofaktor auf das NO bindende Häm d_1 übertragen werden. Durch die Reduktion des Häm d_1 wird NO freigesetzt und der Häm c Kofaktor kann erneut durch externe Elektronendonoren reduziert werden (Rinaldo *et al.*, 2011). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt scheint dabei der intramolekulare Elektronentransfer von Häm c zu Häm d_1 zu sein. Experimentell wurde das Redoxpotential der Kofaktoren von Nitritreduktasen aus verschiedenen Organismen bestimmt, mit variierenden Ergebnissen (Silvestrini *et al.*, 1994; Koppenhöfer *et al.*, 2000; Zajicek *et al.*, 2006). Das Redoxpotential des Häm c Kofaktors wird generell mit ca. +220 mV angegeben. Es kann daher von periplasmatischen Elektronenüberträgern, wie beispielsweise NirM oder Azurin, Elektronen annehmen. Das Redoxpotential des Häm d_1 wird auf +300 mV geschätzt (Warren & Smith, 2010). Die Cytochrom cd_1 Nitritreduktase kann daher die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid, aber nicht zu Ammonium katalysieren. Es konnte bislang nicht abschließend geklärt werden, inwiefern die besonderen Substituenten des Häm d_1 sowie die Proteinumgebung zu diesen Eigenschaften beitragen.

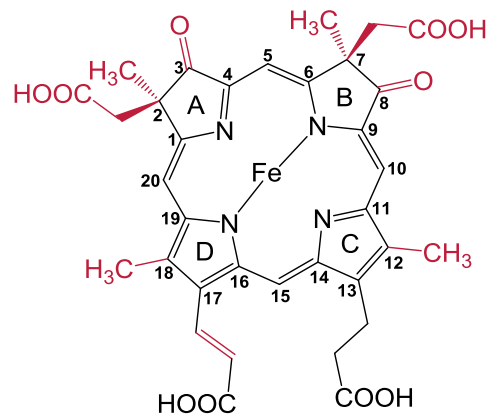


Abb. 1.6: Die Struktur des Isobakteriochlorins Häm d_1 . Die C-Atome des Tetrapyrrolgrundgerüsts sind mit 1-20 nummeriert. Die Pyrrolringe sind mit A-D markiert. Die charakteristischen Substituenten sind rot markiert.

1.6 Das *nir* Operon und die Häm d_1 Biosynthese

Die Enzyme der Häm d_1 Biosynthese sind gemeinsam mit der Nitritreduktase im *nir* Operon codiert, welches von Kawasaki *et al.* 1997 beschrieben wurde (Abb. 1.7 A). Dabei wurden durch Mutagenesestudien diejenigen Gene identifiziert, ohne deren Produkte keine funktionelle Nitritreduktase gebildet wird. Analog zur Synthese anderer Tetrapyrrole, wie beispielsweise Häm b , dient UROGEN als Vorläufer für die Biosynthese von Häm d_1 . Der erste Abschnitt der Häm d_1 Biosynthese, ausgehend von UROGEN, findet im Cytoplasma statt. Daran beteiligt sind die Enzyme NirE, NirDLGH und sehr wahrscheinlich NirJ. NirE ist für die Methylierungen von UROGEN an C2 des A Rings und C7 des B Rings verantwortlich (Storbeck *et al.*, 2009). Die Umwandlung von Precorrin-2 zu Sirohäm konnte bislang nicht abschließend aufgeklärt werden. Jedoch ist im Genom von *P. aeruginosa* CysG codiert, welches bereits in *E. coli* als Sirohäm Synthase identifiziert wurde. Es vereint drei enzymatische Aktivitäten: Die S-Adenosylmethionin abhängige Methylierung von UROGEN zu Precorrin-2, die NAD^+ abhängige Oxidation von Precorrin-2 zu Sirohydrochlorin und die Eiseninsertion in Sirohydrochlorin, bei der das Produkt Sirohäm entsteht (Spencer *et al.*, 1993; Warren *et al.*, 1990). Es wird vermutet, dass CysG auch in *P. aeruginosa* für die Synthese von Sirohäm verantwortlich sein könnte. Die Synthese von 12,18-Didecarboxysirohäm, ausgehend von Sirohäm, wird durch die Sirohäm Decarboxylase NirDLGH katalysiert (Palmer *et al.*, 2014; Haufschildt *et al.*, 2014). Dabei werden die Acetatseitenketten an den Ringen C und D decarboxyliert. Der nächste Schritt der Häm d_1 Biosynthese, das Entfernen von Propionatseitenketten und das Anfügen von Ketogruppen an C3 und C8, könnte

durch das Enzym NirJ erfolgen (Brindley *et al.*, 2010). Der cytoplasmatische Teil der Häm d_1 Biosynthese ist in Abb. 1.7 B gezeigt, auf den letzten Schritt der Biosynthese des Kofaktors, sowie NirF und NirN, wird genauer in Kapitel 1.7 eingegangen.

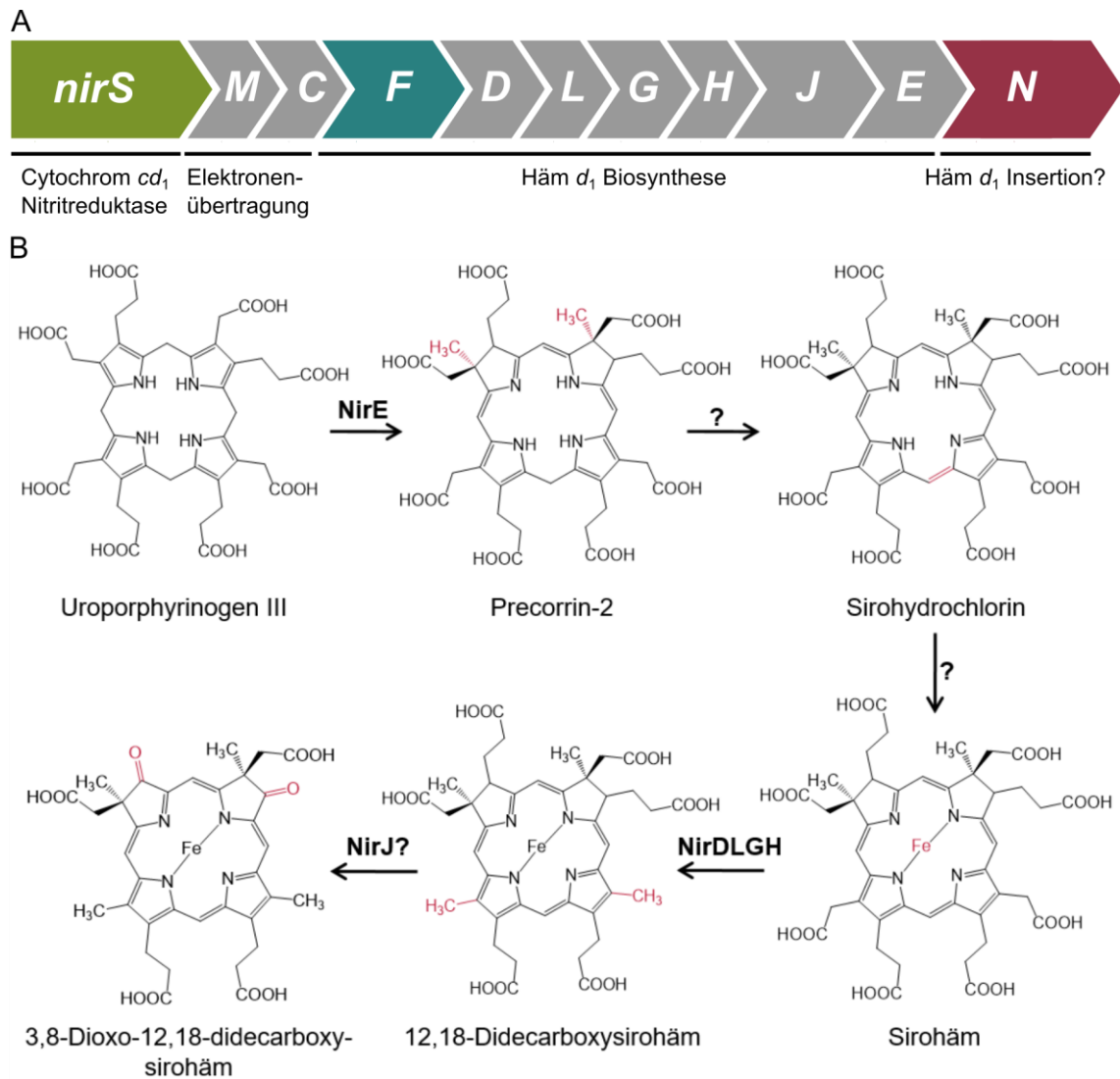


Abb. 1.7: Das *nir* Operon und die cytoplasmatischen Schritte der Häm d_1 Biosynthese. **A** Schematische Darstellung des *nir*-Operons in *P. aeruginosa*. Neben dem Gen für die Nitritreduktase NirS enthält das *nir* Operon die Gene für die Elektronenüberträger NirM und NirC. Des Weiteren sind im Operon die potentielle Dehydrogenase NirF, die Sirohäm-Decarboxylase NirDLGH, das Radical SAM Protein NirJ, die Methyltransferase NirE, sowie das c-Typ Cytochrom NirN codiert. **B** Die cytoplasmatischen Schritte der Häm d_1 Biosynthese und die verantwortlichen Enzyme sind dargestellt. NirE ist in der Lage, Uroporphyrinogen III zu Precorrin-2 umzusetzen. Die Biosynthese von Sirohäm aus Precorrin-2 über Sirohydrochlorin ist bislang nicht aufgeklärt. Sirohäm wird durch NirDLGH decarboxyliert. NirJ ist möglicherweise für die Umsetzung von 12,18-Didecarboxysirohäm zu 3,8-Dioxo-12,18-didecarboxysirohäm verantwortlich.

1.6.1 NirE

Teil des *nir* operons ist *nirE*, welches für ein 30 kDa großes Enzym codiert, das in der Lage ist, Precorrin-2 herzustellen. Dabei handelt es sich um eine S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängige Uroporphyrinogen III Methyltransferase (SUMT). Die Funktion von NirE wurde aufgrund seiner relativ hohen Homologie zu anderen SUMTs, wie CysG und CobA, postuliert (Kawasaki *et al.*, 1997). Die enzymatische Aktivität von NirE als Methyltransferase konnte erstmals 2009 durch Storbeck *et al.* demonstriert werden. Die Kristallstruktur dieses Enzyms wurde 2011 durch Storbeck *et al.* im Komplex mit dem Substrat Uroporphyrinogen III und dem Reaktionsprodukt S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) gelöst (Abb. 1.8).

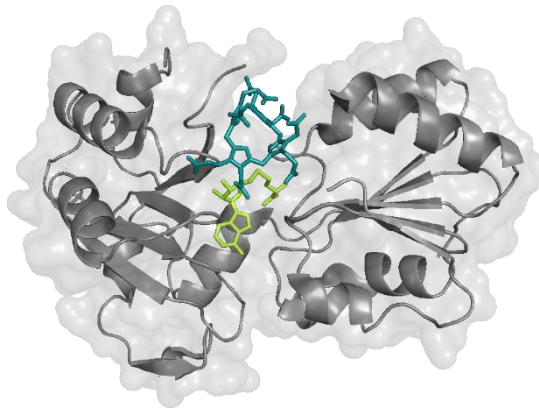


Abb. 1.8: Die Kristallstruktur der SAM-abhängigen Methyltransferase NirE aus *P. aeruginosa* (Storbeck *et al.*, 2011). Die Kristallstruktur von NirE (grau) konnte mit Uroporphyrinogen III (blau) und SAH (gelb) mit einer Auflösung von 2,0 Å gelöst werden.

1.6.2 NirDLGH

Sirohäm, welches den Kofaktor der Sulfitreduktase und mancher Nitritreduktasen darstellt (Murphy *et al.*, 1974), wird im Rahmen der Häm *d*₁ Biosynthese als Intermediat decarboxyliert. Für diesen Schritt ist in *P. aeruginosa* die Sirohäm Decarboxylase NirDLGH verantwortlich. Sie decarboxyliert Sirohäm an den Positionen C12 und C18 um das Produkt 12,18- Didecarboxysirohäm herzustellen. Andere Organismen, wie *H. thermophilus*, weisen statt den vier Proteinen NirDLGH lediglich ein Fusionsprotein NirDL auf, welches Sirohämdecarboxylase Aktivität zeigt (Haufschildt *et al.*, 2014). Die Sirohämdecarboxylase Reaktion wurde zuerst durch Bali *et al.* (2011) in *P. pantotrophus* beschrieben und verläuft über ein mono-decarboxyliertes Intermediat. Die Proteine NirD, NirG (jeweils 17 kDa) NirL und NirH (jeweils 20 kDa) aus *P. aeruginosa* zeigen paarweise Homologie zueinander, und jedes der

vier Proteine ist für die Umsetzung von Sirohäm nötig (Kawasaki *et al.*, 1997). NirDLGH wurden zunächst als Transkriptionsfaktoren der AsnC/Lrp (*asparagine synthase C* und *leucine-responsive regulatory protein*) Familie annotiert (Winsor *et al.*, 2011). Die Strukturen der Sirohäm Decarboxylasen AhbA/B (*Desulfovibrio desulfuricans*) und NirDL (*Hydrogenobacter thermophilus*, Abb. 1.9) konnten 2014 durch Palmer *et al.* bzw. Haufschildt *et al.* gelöst werden. Beide Enzyme zeigen tatsächlich strukturelle Ähnlichkeit zu Vertretern der AsnC/Lrp Familie von Transkriptionsfaktoren und enthalten ein Helix-Turn-Helix Motiv. Es wird daher vermutet, dass die Proteine neben ihrer enzymatischen Aktivität auch eine regulatorische Funktion ausüben könnten. In der Tat konnten Xiong *et al.* 2007 zeigen, dass in *Heliophilum fasciatum* NirL an ein DNA-Fragment 200 bp aufwärts des *nirJ*-Gens binden kann. Für NirDL bzw. NirGH aus *P. aeruginosa* konnte ebenfalls demonstriert werden, dass die Proteine an einen DNA-Bereich aufwärts von *nirJ* binden und vermutlich die Expression der Gene *nirJEN* regulieren können (Walther, 2011).

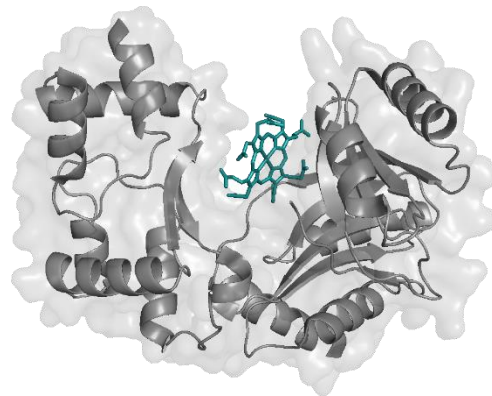


Abb. 1.9: Die Kristallstruktur der Sirohäm Decarboxylase NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* (Haufschildt *et al.*, 2014). Die Kristallstruktur von NirDL (grau) wurde mit einer Auflösung von 2,0 Å mit dem Substratanalogon Eisen-Uroporphyrin III (blau) gelöst.

1.6.3 NirJ

Das Protein NirJ ist als Radical SAM Enzym annotiert und besitzt die für diese Enzyme charakteristische N-terminale Aminosäuresequenz -Cx3Cx2C- (Winsor *et al.*, 2011). Radical SAM Enzyme haben gemeinsam, dass sie mindestens ein Eisen-Schwefel-Cluster besitzen, welches ein Elektron auf SAM überträgt, das dadurch in Methionin und ein 5'-Desoxyadenosylradikal gespalten wird. Das Radikal ist in der Lage, unreaktive C-H Bindungen zu spalten (Sofia *et al.*, 2001). Das Enzym aus *P. pantotrophus* wurde erstmals durch Brindley *et al.* (2010) genauer charakterisiert. Es wird vermutet, dass NirJ im Rahmen der Häm *d*₁

Biosynthese 12,18-Didecarboxysirohäm zu 3,8-Dioxo-12,18-didecarboxysirohäm umsetzt und somit zwei Propionatseitenketten entfernt und zwei Ketofunktionen in den Makrocyclus einführt. NirJ zeigt hohe Homologie zu AhbC der alternativen Häm Biosynthese. Bei dem Substrat dieses Enzyms handelt es sich ebenfalls um 12,18-Didecarboxysirohäm (Bali *et al.*, 2011). Der experimentelle Beweis für die katalytische Aktivität von NirJ fehlt allerdings noch.

1.7 Die letzten Schritte der Häm d_1 Biosynthese

Der letzte Schritt der Häm d_1 Biosynthese und dessen Einbau in die Nitritreduktase finden im Periplasma statt. Der Häm d_1 Vorläufer 3,8-Dioxo-12,18-Didecarboxysirohäm (im Folgenden Dihydrohäm d_1) muss hierfür durch einen bislang unbekannten Transporter in das Periplasma exportiert und zu Häm d_1 konvertiert werden. Auch die Nitritreduktase wird in das Periplasma exportiert. Dies geschieht posttranslational mittels des SEC-Transportsystems (Chatzi *et al.*, 2013). Sobald sich das Protein im Periplasma befindet, erfolgt der Einbau der Kofaktoren Häm d_1 und Häm c , sowie die Dimerisierung der NirS. Zwei weitere Proteine NirF und NirN, die im *nir* Operon codiert sind, zeigen wie die NirS eine periplasmatische Lokalisierung (Bali *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2001). NirS, NirN und NirF bilden während der Maturation der Nitritreduktase einen Komplex, wobei die Interaktion von NirN und NirS durch NirF ermöglicht wird (Nicke *et al.*, 2013). Auch bei Interaktionsstudien mittels der NO-Reduktase NorBC konnte die Beteiligung der drei Proteine an einem übergeordneten Komplex aus Proteinen der Denitrifikationsmaschinerie gezeigt werden (Borrero-de Accuña *et al.*, 2016). NirF und NirN könnten aufgrund ihrer Lokalisation und ihrer engen Assoziation mit der Nitritreduktase potentiell am letzten Schritt der Häm d_1 Biosynthese beteiligt sein. Dieser finale Schritt der Häm d_1 Biosynthese besteht formal aus der Abspaltung von zwei H-Atomen der Propionatseitenkette an C17, wobei eine Acrylatseitenkette entsteht (Abb. 1.10). NirF ist als potentielle Dehydrogenase annotiert und könnte diese Reaktion katalysieren (Bali *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass NirN Häm d_1 binden und auf eine Häm d_1 freie NirS übertragen kann (Zajicek *et al.*, 2009). Es ist daher möglich, dass NirN an der Maturation der Nitritreduktase beteiligt ist.

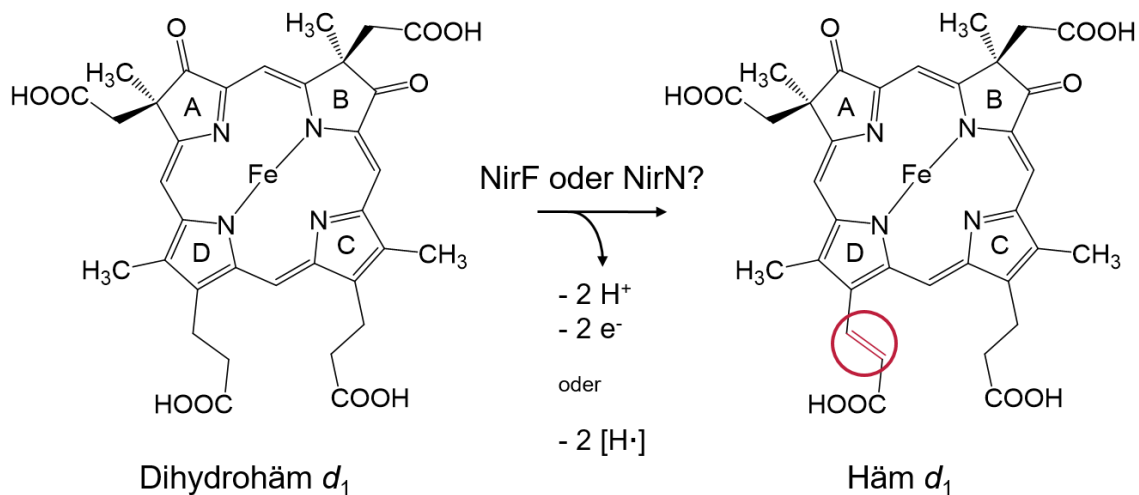


Abb. 1.10: Der letzte Schritt der Häm d_1 Biosynthese. Der Häm d_1 Vorläufer, Dihydrohäm d_1 , wird durch die Abspaltung von formal zwei H-Atomen der Propionatseitenkette an C17 des D-Rings in Häm d_1 umgewandelt. Dabei entsteht eine Acrylatseitenkette. Dieser Schritt der Häm d_1 Biosynthese findet im Periplasma statt. Somit kommen die periplasmatischen Proteine NirF und NirN für die Katalyse dieses Schritts in Frage.

1.7.1 NirF

NirF ist ein 45 kDa großes periplasmatisches Protein, welches in *P. aeruginosa* durch seinen Lipidanker an der äußeren Seite der Cytoplasmamembran verankert ist (Nicke *et al.*, 2013; Remans *et al.*, 2010). NirF zeigt eine 20 %ige Aminosäuresequenzidentität zur NirS. Eine *nirF* Deletion in *P. aeruginosa* weist einen starken Wachstumsphänotyp unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat als Elektronenakzeptor auf, da kein Häm d_1 gebildet wird. Es wurde daher vermutet, dass NirF an der Häm d_1 Biosynthese beteiligt sein muss, möglicherweise am letzten Schritt der Biosynthese (Kawasaki *et al.*, 1997). Jedoch könnte NirF auch als Gerüstprotein für die Interaktion verschiedener an der Denitrifikation oder der Maturation der Nitritreduktase beteiligter Proteine fungieren. Es konnte gezeigt werden, dass NirF *in vitro* in der Lage ist, Häm d_1 zu binden (Bali *et al.*, 2010).

1.7.2 NirN

NirN wird durch das letzte Gen im *nir* operon codiert. Es handelt sich um ein c-Typ Cytochrom von ca. 52 kDa, welches durch seine N-terminale Exportsequenz im Periplasma lokalisiert ist (Hasegawa *et al.*, 2001). Das Protein weist 24 % Sequenzidentität zur NirS auf. NirN ist in der Lage, Häm d_1 zu binden und an eine semi-apo NirS zu übertragen (Zajicek *et al.*, 2009). Bislang wurde NirN keine Rolle in der Biosynthese von Häm d_1 zugeschrieben, da eine *nirN* Mutante in *Paracoccus pantotrophus* in der Lage war, eine funktionelle holo NirS herzustellen (Zajicek *et al.*, 2009). Im Rahmen von Wachstumsexperimenten

zeigte diese *nirN* Mutante nur ein leicht vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp Stamm. Interessanterweise wies eine Δ *nirN* Mutante in *P. aeruginosa* jedoch eine reduzierte Nitritreduktaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp auf (Hasegawa *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1997). Nicke *et al.* konnten 2013 Hinweise dafür finden, dass sich der Kofaktorgehalt der NirS in der *P. aeruginosa* Δ *nirN* Mutante (RM361, *nirN::tet*, Kawasaki *et al.*, 1997) im Vergleich zum Wildtyp verändert. Das typische Absorptionsmaximum des Häm *d*₁ Kofaktors war in periplasmatischen Extrakten der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Li *et al.* 2013 auch für *Magnetospirillum gryphiswaldense* beschrieben. Die Autoren schlossen daraus, dass NirN am korrekten Einbau von Häm *d*₁ in die NirS oder an der Biosynthese von Häm *d*₁ beteiligt sein könnte. Die Möglichkeit, dass NirN an der Häm *d*₁ Biosynthese beteiligt sein könnte, wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

1.7.3 NirM und NirC

Neben der Nitritreduktase NirS, NirF und NirN weisen die Proteine NirM und NirC eine periplasmatische Lokalisierung auf. Dabei handelt es sich um *c*-Typ Cytochrome, die ebenfalls im *nir* Operon codiert sind. NirM (Cytochrom *c*₅₅₁) wurde als physiologischer Elektronendonator für NirS identifiziert (Jüngst *et al.*, 1991; Arai *et al.*, 1990). Es handelt sich dabei um ein 11 kDa großes Protein, dessen Struktur bereits 1982 durch Matsuura *et al.* aufgeklärt wurde (Abb.: 1.12). Das 11 kDa große NirC wurde erstmals 2001 durch Hasegawa *et al.* gereinigt und auf seine Funktion hin untersucht. NirS war in der Lage, reduziertes NirC zu oxidieren. NirC konnte wiederum durch die Membranfraktion reduziert werden. NirC könnte somit ebenfalls einen physiologischen Elektronendonator für NirS darstellen, wenngleich NirM ein 10-fach stärkerer Elektronendonator für NirS ist (Hasegawa *et al.*, 2001). Ye *et al.* (1992) und de Boer *et al.* (1994) berichteten von einer Häm *d*₁ freien Nitritreduktase in *nirC* Mutanten in *Pseudomonas fluorescens* und *Paracoccus denitrificans*. NirC könnte daher ebenfalls eine Funktion in der Häm *d*₁ Biosynthese oder der Maturation der NirS einnehmen.

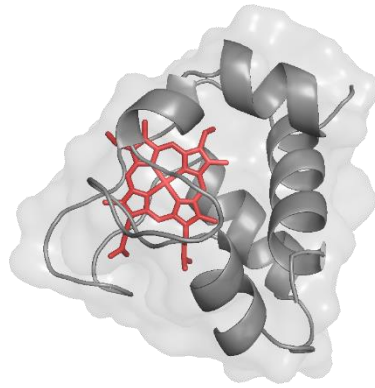


Abb. 1.12: Die Kristallstruktur des c-Typ Cytochroms NirM (Cytochrom c_{551}) (Matsuura *et al.* 1982). Die NirM Struktur (grau) aus *P. aeruginosa* wurde mit kovalent gebundenem Häm *c* (rot) mit einer Auflösung von 1,6 Å gelöst.

1.8 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die finalen Schritte der Biosynthese des Nitritreduktase Kofaktors Häm d_1 im Periplasma und dessen Einbau in das semi-apo Enzym aufgeklärt werden. Dafür sollte die Funktion der beiden Proteine NirF und NirN genauer untersucht werden. NirF könnte als potentielle Dehydrogenase an der Umsetzung der Propionatseitenkette in eine Acrylatseitenkette des Isobakteriochlorins beteiligt sein (Bali *et al.*, 2010). NirF scheint außerdem essentiell für die Herstellung einer funktionalen Nitritreduktase in *P. aeruginosa* zu sein (Kawasaki *et al.*, 1997). NirN könnte am Transport und der Insertion des Kofaktors in die Nitritreduktase beteiligt sein (Zajicek *et al.*, 2009). Obwohl NirN zunächst nicht essentiell für die Bildung von Häm d_1 zu sein schien (Kawawsaki *et al.*, 1997), konnten Nicke *et al.* 2013 jedoch Hinweise dafür finden, dass in einer $\Delta nirN$ Mutante in *P. aeruginosa* kein korrekter Einbau bzw. keine vollständige Biosynthese von Häm d_1 in *P. aeruginosa* stattfindet. Zunächst sollte daher die *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante RM361 (Kawasaki *et al.*, 1997) bezüglich des Kofaktorgehalts der Nitritreduktase NirS charakterisiert werden. Dazu sollte ein Protokoll für die Produktion und Reinigung der Nitritreduktase aus der $\Delta nirN$ Mutante etabliert und das gereinigte Enzym mittels spektroskopischer Methoden im Vergleich zu dem Enzym aus dem *P. aeruginosa* Wildtyp untersucht werden. Des Weiteren sollte der enthaltene Kofaktor auf seine Identität mittels Massenspektrometrie geprüft werden. So sollte festgestellt werden, ob es sich bei dem Nitritreduktasekofaktor aus der $\Delta nirN$ Mutante RM361 möglicherweise um einen Vorläufer von Häm d_1 handeln könnte. Dies würde bedeuten, dass NirN, anstelle von NirF, für den letzten Schritt der Häm d_1 Biosynthese verantwortlich sein könnte. Weiterhin sollten sowohl NirN als auch NirF auf eine mögliche enzymatische Aktivität getestet werden, wobei gezeigt werden sollte, dass die Acrylatseitenkette des Häm d_1 gebildet wird. Auch der Transport und die Übertragung von Häm d_1 auf die Nitritreduktase sollten genauer untersucht werden. Schließlich sollten NirN und NirF kristallisiert werden, um die Strukturen dieser Proteine zu lösen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Geräte, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden aufgeführt.

Agarose-Gelelektrophoresekammer:

Mini-Sub® Cell GT, Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA

Anaerobe Werkbänke:

Vinyl Glove Box, Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA

Autoklaven:

LVSA 50/70, Zirbus technology GmbH, Bad Grund, Deutschland

FVA/A1, Fedegari Autoklaven AG, Bedano, Schweiz

Blot-Apparatur:

Trans-Blot® Turbo Transfer System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Chromatographie:

Äkta Purifier™ UV-900, GE Healthcare Ltd, München, Deutschland

Äkta pure™, GE Healthcare Ltd., München, Deutschland

Superdex™ 75 10/300, GE Healthcare Ltd, München, Deutschland

Superdex™ 200 10/300, GE Healthcare Ltd, München, Deutschland

XK 16/40, GE Healthcare Ltd, München, Deutschland

Dokumentation:

Dark Hood DH-50, biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland

DeVision D Box, Decon Science Tec GmbH, Hohengandern, Deutschland

Elektroporationsgerät:

Elektroporator 2520, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

HPLC:

JASCO 2000 mit MD-2015Plus und FP-2020Plus, JASCO GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland

Equisil BDS C18-2, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland

Peprosil-Pur C18-AQ, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland

Inkubationsschüttler:

TR-150, Infors AG, Bottmingen, Schweiz

HT Aquatron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Kreisschüttler 3020, GFL, Burgwedel, Deutschland

Magnetrührer:

IKA® RCT basic safety control, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

IKA® Combimag RCO, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Mikrowelle:

LG MS-1922G, LG Electronics GmbH, Ratingen, Deutschland

pH-Meter:

SevenEasy, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland

Photometer:

NanoDrop® ND-1000, GE Healthcare Ltd., München, Deutschland

iMark™ Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Ultrospec 2100 pro UV/Visible, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK

V-650 Spectrophotometer, JASCO GmbH, Groß-Umstadt, Deutschland

Schüttler:

Vortex-Genie® 2, Scientific Industries Inc, Bohemia, USA

IKA® KS 130 basic, IKA GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

SDS-PAGE Gelelektrophoreseapparatur:

Mini-Protean® Tetra System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Spannungsgerät:

Powerpac™ Basic, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Thermoblöcke:

Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Thermostat plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Thermocycler

MyCycler™ thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Tiefkühlschränke:

V.I.P. Series -86 °C MDF-U71V, SANYO, Wood Dale, USA

Ultraschallgerät:

Ultraschallbad eurolab, Merck, Darmstadt, Deutschland

Vakuumgeräte:

Speed Vac Concentrator plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Membranpumpe MZ 2C/2.4, Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland

Waagen:

Präzisionswaage Talent TE1502S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Analysewaage Talent TE124S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Reinstwasseranlage

Q-Gard® 2, Millipore Corporation, Billerica, USA

Zellaufschlussgeräte:

French® Pressure Cell Press (40K Zelle), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

FastPrep-24TM 5G Homogenizer, MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tischzentrifuge mini Spin®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Ultrazentrifuge L-90K (Rotoren: 45 Ti, 70 Ti), Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA

Erntezentrifuge Avanti® J-26 XP (Rotor: JLA 8.1), Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Herstellern bezogen: Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland), Gerbu Biotechnik (Heidelberg, Deutschland), Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland), Fluka® (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt, Deutschland), Riedel de Haën® (Seelze, Deutschland), Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Qiagen (Hilden, Deutschland). Die Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Antikörper sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Enzyme und Antikörper

Enzyme und Antikörper	Hersteller
α Maus-IgG AK und α Maus-IgM AK aus Ziege AP Konjugat	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Alkalische Phosphatase, Arctic	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Benzonase Nuklease	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
BitNuklease	Bioutil (Houston, USA)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes (Waltham, USA)
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Strep-Tactin AP-Konjugat	IBA (Göttingen, Deutschland)
T4 Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Die verwendeten Kits und Marker sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.2: Verwendete Kits und Marker

Kits und Marker	Hersteller
mi-Plasmid Miniprep Kit	Metabion (International AG, Planegg, Deutschland)
Rapid DNA-Ligation Kit	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Infusion Kit	Takara Clontech (Göteborg, Schweden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal AmSO ₄ Suite	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal Anions Suite	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal Cations Suite	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal Cryos Suite	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal Index Suite	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal JCSG Core I-IV Suites	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal ProComplex	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
NeXtal JCSG Core+	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
PGA TM	Molecular Dimensions (Suffolk, UK)
Midas TM	Molecular Dimensions (Suffolk, UK)
Morpheus TM	Molecular Dimensions (Suffolk, UK)
Gel-Filtration Markers Kit (12 kDa – 200 kDa)	Sigma-Aldrich (St Luis, USA)
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)

2.1.3 Hilfsmittel

Alle Hilfsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Verwendete Hilfsmittel.

Hilfsmittel	Hersteller
Afnor-Schraubflaschen mit Butylstopfen	Zscheile & Klinger (Hamburg, Deutschland)
Blotpapier Whatman	NeoLab (Heidelberg, Deutschland)
Blot Membran Roti-PVDF	Merck (Millipore Ltd, Cork, Irland)
Filter Filtropur (0.2, 0.45)	Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland)
Filter Filtropur BT50 (0.2, 500 mL)	Sarstedt AG (Nümbrecht, Deutschland)
Glaskörner 70-100 µm	Kuhmichel GmbH (Ratingen, Deutschland)
Glasperlen, Durchmesser 4 mM	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Konzentratoren AmiconR Ultra 0.5 mL 10K	Merck Millipore Ltd (Cork, Ireland)
Konzentratoren Vivaspin 50, 10 K	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Kristallisationsplatten Intelli PlateR 96	Art Robbins Instruments (Sunnyvale, USA)
Küvette (Polystyrol) 10 mM	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Küvette (Quarzglas)	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)
Leersäule Poly-prepR Column	Bio-Rad (Hercules, USA)
Microplates Nunc™ MicroWell™ 96 Well	Thermo Scientific (Roskilde, Dänemark)
Säulenmaterial Q-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Ltd (München, Deutschland)
Säulenmaterial SP-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Ltd (München, Deutschland)
Strep-Tactin HC Fast Flow	IBA (Göttingen, Deutschland)

2.1.4 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.4: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung	Referenz
<i>E. coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galk</i> λ - <i>rpsL nupG</i>	Klonierung	Grant <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> ST18	<i>pro thi hsdR</i> + Tpr Smr; chromosome::RP4-2 Tc::Mu-Kan::Tn7 λ <i>pir</i> Δ <i>hemA</i>	Transformation von <i>P. aeruginosa</i> durch Mating	Thoma & Schobert (2009)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ (DE3)	Rekombinante Proteinproduktion	Studier & Moffatt (1986)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Proteinproduktion Nitritreduktase Nir _{SWT}	Dunn & Holloway (1971)
<i>P. aeruginosa</i> RM361	PAO1 <i>nirN</i> :: <i>tet</i>	Proteinproduktion Nir _{SΔN}	Kawasaki <i>et al.</i> (1997)
<i>P. aeruginosa</i> RM301	PAO1 <i>nirF</i> :: <i>tet</i>		Kawasaki <i>et al.</i> (1997)
<i>P. aeruginosa</i> RM488	PAO1 <i>nirS</i> :: <i>tet</i>		Kawasaki <i>et al.</i> (1995)

2.1.5 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.5 gezeigt.

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pET22b(+)	MCS: <i>pelB</i> Signalsequenz N-terminal, <i>his6</i> C-terminal, Amp ^r	Novagen Merck (Millipore Ltd, Cork, Irland)
pET22bStrepII <i>nirN</i>	NirN (<i>P. aeruginosa</i>) hinter <i>pelB</i> -StrepII, Amp ^r	Nicke (2013)
pET22b <i>nirFD.s.PCS</i> StrepII	Codon optimierte NirF (<i>D. Shiba</i>) hinter <i>pelB</i> , vor PCS & StrepII, Amp ^r	Nicke (2013)
pET22b <i>nirS</i>	NirS (<i>P. aeruginosa</i>) hinter <i>pelB</i> , Amp ^r	Nicke (2013)
pEC86	<i>ccmA-H</i> Gencluster, Clm ^r	Arslan <i>et al.</i> (1998)
pHAP1	pUCP18 mit 9 kB <i>P. aeruginosa nir</i> Operon Fragment, Amp ^r	Arai <i>et al.</i> (1990)
pHAE2	<i>P. aeruginosa nir</i> Operon Fragment, Amp ^r	Arai <i>et al.</i> (1990)
pET22bStrepII <i>nirNH147A</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNH147Q</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNH323A</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNH323Q</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNH417A</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNH417Q</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNY461F</i>	NirN AS-Austausch	diese Arbeit
pET22bStrepII <i>nirNPQW</i>	NirN Deletion des N-Terminus vor AS-Sequenz PQW	diese Arbeit
pUCP20T	<i>E. coli</i> - <i>Pseudomonas</i> shuttle Vektor, Amp ^r	Schweizer <i>et al.</i> (1996)
pUCP20T <i>nirN</i>	pUCP20T mit NirN Leader und nativer NirN aus <i>P. aeruginosa</i> , Amp ^r	diese Arbeit
pUCP20T <i>nirN</i> cterm	pUCP20T <i>nirN</i> mit Deletion des NirN N-Terminus vor AS-Sequenz ADP, Amp ^r	diese Arbeit

2.1.6 Oligonukleotidprimer

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotidprimer

Primer Name	Sequenz 5' - 3'	Schnittstelle	Zweck
M13 fw.	TGTAACACGACGGCCAGT	-	pUCP20T Sequenzierung
M13 rev.	CAGGAAACAGCTATGACC	-	pUCP20T Sequenzierung
NirN fw.	GCGCGAATTCATGCGCCTGATC GGC	EcoRI	NirN mit Leader Nativ aus pHAE2 für pUCP20t
NirN rev.	GCGCAAGCTTTCAGTGCGAGGT TCC	HindIII	NirN reverse Primer
NirN N-term del. Fw.	GCAGAATTCATGCGCCTGATCG GCCTCGCCCTCGGCCTGCTCCT CGGCGCCCTCCACAGGCCGCC GACCCGCTGAACCTGTTCTG	EcoRI	NirN N-Terminus Deletion für pUCP20T mit nativem Leader
PQW fw.	CCGCAGTGAGCGCCGAGGAC ATCC	NcoI	NirN N-Terminus Deletion für pET22b(+)
PQW rev.	GGCGCTCCACTGCGG AGCTTTTTCGAACTG	HindIII	NirN N-Terminus Deletion für pET22b(+)
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	-	pET22b Sequenzierung
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	-	pET22b Sequenzierung
H147A fw.	GCCCTGGCCGGAGGTCCGAAG TTC	-	Mutagenese NirN
H147A rev.	ACCTCCGGCCAGGGCGTAGCG CGA	-	Mutagenese NirN
H147Q fw.	TACGCCCTGCAAGGAGGTCCGA AGTTCTCCCCG	-	Mutagenese NirN
H147Q rev.	TCCTTGCAAGGCGTAGCGCGA GGGGAAGCG	-	Mutagenese NirN
H323A fw.	CCGGCCCTCGGCTCGGGCATC TACTGGAAG	-	Mutagenese NirN
H323A rev.	CGAGCCGAGGGCCGGCATGCC CGACAGCGG	-	Mutagenese NirN
H323Q fw.	CCGCAACTCGGCTCGGGCATCT ACTGGAAG	-	Mutagenese NirN
H323Q rev.	CGAGCCGAGTTGCGGCATGCC CGACAGCGG	-	Mutagenese NirN

H417A fw.	GCCGGCGCCGTCGAGTTCACC CGC	-	Mutagenese NirN
H417A rev.	CTCGACGGCGCCGGCCACCTT GCC	-	Mutagenese NirN
H417Q fw.	GCCGGCCAAGTCGAGTTCACCC GC	-	Mutagenese NirN
H417Q rev.	CTCGACTTGGCCGGCCACCTTG CC	-	Mutagenese NirN
Y461F fw.	GGCAAGTTCAACGTCGGCAACA AG	-	Mutagenese NirN
Y461F rev.	GACGTTGAACTTGCCCGACGGC TT	-	Mutagenese NirN

2.1.7 Medien und Medienzusätze

LB Medium (Sambrook & Russel, 2001)

Trypton aus Casein	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

Festmedium zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar

TB Medium (Sambrook & Russel, 2001)

Trypton aus Casein	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerin	4 mL/L
in 900 mL ddH ₂ O gelöst, autoklaviert	
Kaliumhydrogenphosphat Puffer 0,89 M	100 mL/L
Autoklavieren, frisch hinzugeben	

Kaliumhydrogenphosphat Puffer für TB Medium

K ₂ HPO ₄	0,72 M
KH ₂ PO ₄	0,17 M

Autoinduktionsmedium ZYM 5052 (Studier, 2005)

Trypton aus Casein	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
25x M Lösung	40 mL/L
MgSO ₄ 1 M	1 mL/L
50x 5052 Lösung	20 mL/L
1000x TMM-Lösung	1 mL/L

25x M Lösung

Na ₂ HPO ₄	0,625 M
K ₂ HPO ₄	0,625 M
NH ₄ Cl	1,25 M
Na ₂ SO ₄	0,125 M

50x 5052 Lösung

Glycerin	250 g/L
Glucose	25 g/L
Lactose-Monohydrat	100 g/L

sterilfiltriert

1000x TMM-Lösung (1 mL/L)

FeCl ₃	50 mM
CaCl ₂	20 mM
MnCl ₂	10 mM
ZnSO ₄	10 mM
CoCl ₂	10 mM
CuCl ₂	2 mM
NiCl ₂	2 mM
Na ₂ MoO ₄	2 mM
Na ₂ SeO ₃	2 mM
H ₃ BO ₃	2 mM

in 60 mM HCl gelöst, sterilfiltriert

AB Medium (verändert nach Heydorn *et al.*, 2000)

A10 Lösung	100 mL/L
1 M Glucose	20 mL/L
1 M MgSO ₄	1 mL/L
1 M MgCl ₂	1 mL/L
14 mg/mL FeSO ₄	0,5 mL/L
Spurenelementlösung	1 mL/L
1 M CaCl ₂	0,1 mL/L
5 M NaNO ₃	15 mL/L
200 mM ALA	1 mL/L

800 mL doppelt destilliertes Wasser wurde in Anaerobenflaschen vorgelegt und autoklaviert. Die Komponenten wurden frisch am Tag der Kultivierung dazugegeben.

A10 Lösung

(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
KH ₂ PO ₄	30 g
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	90 g

Spurenelementlösung für AB Medium

CaSO ₂ x 2 H ₂ O	200 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	20 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	20 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg
H ₃ BO ₃	5 mg

in ddH₂O gelöst, auf 1 L aufgefüllt, sterilfiltriert

Die verwendeten Medienzusätze sind in Tabelle 2.7 dargestellt.

Tab. 2.7: Verwendete Medienzusätze

Medienzusatz	Lösungsmittel	Konzentration SL	Endkonzentration
5-Aminolävulinsäure (ALA)	Dest. Wasser	75 mg/mL	75 µg/mL
		200 mg/mL	200 µg/mL
Ampicillin	Dest. Wasser	100 mg/mL	100 µg/mL
Carbenicillin	Dest. Wasser	250 mg/mL	250 µg/mL
Chloramphenicol	Ethanol	34 mg/mL	34 µg/mL
Tetracyclin	Ethanol (50 % v/v)	20 mg/mL	80 µg/mL
IPTG	Dest. Wasser	1 M	100 µM, 500 µM

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Die Sterilisation von Medien, Puffern und Lösungen sowie Materialien fand bei 121°C und 2 bar für 20 min statt. Hitzeempfindliche Lösungen, wie Antibiotika oder Spurenelemente, wurden zur Sterilisation durch einen Membranfilter filtriert (Porengröße 0,2 µm). Nach der Kultivierung wurden Mikroorganismen vor der Entsorgung ebenfalls dampfsterilisiert.

2.2.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien können auf Festmedium kultiviert werden. Dabei kommen LB-Agar-Platten zum Einsatz. Diese wurden mit Bakterien inokuliert, indem sie mittels einer Impföse im 9-Strich-Verfahren, z.B. aus einer Glycerinkultur, ausgestrichen wurden. Auch nach der Transformation von Bakterien wurden Agar Platten verwendet. Dabei wurden Bakterien nach erfolgter Transformation mittels Glasperlen auf den Platten verteilt. Für die Selektion wurde Festmedium mit entsprechenden Antibiotika oder mit 5-Aminolävulinsäure versetzt. Die Kultivierung der Platten erfolgte über Nacht (ü.N.) bei 37° C im Dunkeln. Für die kurzzeitige Lagerung wurden LB-Agar Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C bis zu einer Woche gelagert.

Von einer Kultur auf Festmedium können Flüssigkulturen inokuliert werden. Für die Plasmidpräparation aus potentiell positiven Klonen nach einer Transformation wurden 7 mL Flüssigmedium mit einer Kolonie inokuliert und ü.N. Bei 37 °C und 200 rpm im Dunkeln inkubiert. Wurde eine Vorkultur für eine Proteinproduktion benötigt, so wurden mit einer Kolonie 50 mL flüssiges LB-Medium inokuliert.

Größere Vorkulturen wurden 1:100 inokuliert. Die Hauptkulturen, die typischerweise 1 L Volumen hatten, wurden ebenfalls 1:100 inokuliert. Bei der Kultivierung von *E. coli* kamen dabei 2 L Erlenmeyerkolben zum Einsatz, für anaerobe *P. aeruginosa* Kulturen wurden 1 L Anaerobenflaschen verwendet, die mit Butylsepten verschlossen wurden. Nach der Kultivierung einer Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden daraus Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurden 800 µL Kultur mit 400 µL 80 %igem (v/v) Glycerin vorsichtig gemischt und bei -80 °C eingefroren und gelagert. Die Bakterien konnten so mehrere Jahre bewahrt werden.

2.2.3 Bestimmung der Zelldichte

Die optische Dichte einer Bakterienkultur bei 600 nm wurde zur Bestimmung der Zelldichte herangezogen. Dabei wurde die OD₆₀₀ mittels des UV/Vis-Spektrophotometers Ultrospec 2000 (GE Healthcare, München, Deutschland) bestimmt. War die OD größer als 1, so wurde die Bakteriensuspension 1:10 (v/v) in Kulturmedium verdünnt. Eine OD₆₀₀=1 entspricht dabei einer Zellzahl von 10⁹ Zellen / mL Kultur.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion zur DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA, entweder zur Amplifikation eines Inserts für die Klonierung, zur Überprüfung von Klonen auf das enthaltene Insert (Kolonie-PCR) oder für die Linearisierung von Plasmiden bei der inversen PCR. Als Template wurden 5-25 ng Plasmid-DNA verwendet. Für die PCR wurden Primer eingesetzt, die in der Regel zwischen 15 und 30 Nukleotide lang waren. Sie wurden in einer Konzentration von 0,5 µM eingesetzt. Die Primer waren komplementär zum Template und enthielten für die klassische Klonierung einen nicht komplementären 5' Überhang mit der entsprechenden Sequenz für Restriktionsschnittstellen. Weitere drei Nukleotide am 5' Ende der Primer stellten sicher, dass die Restriktion durch Endonucleasen einwandfrei funktionierte. Weitere Bestandteile eines PCR Ansatzes waren jeweils 200 µM jedes der Desoxyribonukleotide (dNTPs) und je nach Beschaffenheit des Templates 1 µL einer entsprechenden Polymerase und 5-10

μL ihres Puffersystems. Der PCR-Ansatz wurde mit sterilem dH_2O auf 25 oder 50 μL aufgefüllt. Ein typischer PCR Ansatz ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

Tab. 2.8: PCR Ansatz

Bestandteile	Volumen
DNA-Polymerase Puffer (5x)	5 μL
DNA Polymerase	0.5 μL
Template DNA	5-25 ng
Primer 1 (10 pmol/ μL)	1 μL
Primer 2 (10 pmol/ μL)	1 μL
dNTP (10 mM)	0.5 μL
dH_2O	ad. 10 μL

Die PCR wurde im MyCycler Gerät der Firma Biorad (Hercules, USA) durchgeführt. Das entsprechende PCR-Programm (Tabelle 2.9) enthält einen anfänglichen Schritt zur Denaturierung der doppelsträngigen Template DNA (98 °C, 2 min). Die Amplifikation fand dann in 35 Zyklen von Denaturierung (98°C), Primer Anlagerung (Annealing) für 10-30 s bei 50-72 °C und Elongation durch die Polymerase (72 °C) statt. Die Dauer der Elongation wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks ausgewählt. Je nach Polymerase variierte diese Dauer zwischen 10 s und 4 min. Das entsprechende PCR-Programm ist in Tabelle 2.9 dargestellt. Für Primer mit besonders hoher Schmelztemperatur konnte eine Annealing-Temperatur von 72 °C und damit eine 2-Schritt PCR gewählt werden. Die PCR wurde mit einer finalen Elongation (4 – 10 min) beendet. Die kurzfristige Lagerung von PCR-Produkten erfolgte bei 4 °C. Langfristig wurde amplifizierte DNA bei -20°C gelagert. Der Erfolg einer PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Im Falle einer Amplifikation unspezifischer DNA Fragmente wurde das gewünschte Amplifikat durch eine Gelextraktion isoliert.

Tab. 2.9 PCR Programm

PCR-Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Zahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	120	98	1
Denaturierung	15	98	30-35
Primer-Annealing	30	52-72	
Elongation	variabel	72	
Finale Elongation	320	72	1
Lagerung	∞	4	1

2.3.2 Kolonie PCR

Die Kolonie PCR wurde zur schnellen Überprüfung mehrerer Klone nach einer Klonierung und Transformation auf ein entsprechendes Insert genutzt. Als Template dienten dabei Einzelkolonien, die entsprechend für die PCR vorbereitet wurden. Hierfür wurden die Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte isoliert und in 50 μL dH_2O überführt. Diese Ansätze wurden dann für 10 min bei 98 °C erhitzt, um die DNA freizusetzen und anschließend kurz zentrifugiert, um Bestandteile der bakteriellen Zellwand zu entfernen. 1 μL der Ansätze wurden dann entsprechend Tabelle 2.8 als Template für eine PCR eingesetzt und die PCR nach Tabelle 2.9 durchgeführt. Für eine Kolonie PCR wurde die Taq- oder die Phusion-Polymerase verwendet. Nach Überprüfung der Kolonie-PCR durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechend positiven Klone für eine Übernacktkultur und die folgende Plasmidpräparation eingesetzt.

2.3.3 Einführung von Punktmutationen und Deletionen mittels inverser PCR

Zur Generierung von Mutationen einzelner Basen oder gesamter Codons, sowie Deletionen größerer DNA-Fragmente wurde das Infusion HD Cloning Kit (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Dafür wurde das Zielplasmid zunächst mittels der Q5-Polymerase durch eine inverse PCR linearisiert. Die Primer mussten dabei so gewählt werden, dass sie einander am 5' Ende um 15 Basenpaare überlappen. Der überlappende Bereich muss dabei die zu verändernden Basen enthalten. Bei Deletionen muss darauf geachtet werden, dass der überlappende Bereich außerhalb des zu deletierenden DNA-Fragments ansetzt. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass sie 25-30 Basen lang waren. Die Schmelztemperaturen der Primer waren im Allgemeinen höher als vom Hersteller empfohlen. Die PCR wurde dann nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alternativ wurde die PCR nach Tabelle 2.8 bzw. 2.9 zusammengesetzt und durchgeführt.

Der Erfolg dieser inversen PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Waren auch unspezifische Produkte auf dem Gel zu sehen, so wurde entweder das gewünschte Produkt durch Gelextraktion isoliert, oder neue Primer erstellt, in denen die Mutation um ein Codon verschoben vorliegt, beziehungsweise die eine höhere Annealing-Temperatur aufweisen. Nach

erfolgreicher PCR wurde entgegen den Vorgaben des Herstellers die PCR Reaktion direkt für eine Infusion-Reaktion eingesetzt. Ein Infusion-Reaktionsansatz wurde nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Die Reaktion wurde bei 50 °C für 15 min inkubiert. Für die Transformation wurden die mitgelieferten Stellar-Zellen verwendet, von der Infusion-Reaktion wurden dafür 2,5 µL eingesetzt. Von den erhaltenen Klonen wurden vier als Übernachtskultur kultiviert. Die Klone wurden daraufhin mittels Plasmidpräparation und anschließender Sequenzierung überprüft.

2.3.4 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von Plasmiden sowie mittels PCR amplifizierter DNA Fragmenten wurde mittels Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dabei wurde sich nach Angaben des Herstellers der Endonukleasen gerichtet (New England Biolabs, Ipswich, USA). Ein Restriktionsansatz enthält dabei die zu spaltende DNA, die Nukleasen, sowie das für das jeweilige Enzym passende Puffersystem. Die Restriktion wurde für einen analytischen Verdau mit HF-Enzymen für ca. 10 sec bei 800 W in der Mikrowelle durchgeführt. Ein präparativer Verdau erfolgte für 2-3 h bei 37 °C. Die Restriktionsansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft, durch die Gelelektrophorese wurden auch die Restriktionsendonukleasen abgetrennt. Die Restriktionsenzyme können außerdem nach Angaben des Herstellers durch hohe Temperaturen inaktiviert werden.

2.3.5 Trennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR Reaktionen, Restriktionsspaltungen und zur Trennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Das Agarosegel wird dabei in TAE-Puffer mit 1 % (w/v) Agarose vorbereitet. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit der passenden Menge 6x Loading Dye (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland) gemischt. Ein entsprechender Marker zur Abschätzung der Größen der DNA-Fragmente wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese verlief in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in TAE-Puffer für ca. 50 min bei 100-120 V. Nach beendeter Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNA Fragmente durch Färbung des Gels mit 0,1 %iger (v/v) Ethidiumbromidlösung für 15 min sichtbar gemacht. Durch das Interkalieren des Ethidiumbromids in die DNA kann

das Ergebnis der Elektrophorese mittels UV-Licht betrachtet und aufgezeichnet werden, dies erfolgte in einer Dunkelkammer (Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland).

TAE-Puffer

Tris Acetat, pH 8,0	40 mM
EDTA	1 mM

6x Loading Dye

Bromphenolblau	350 µM
XylenCyanol FF	450 µM
Glycerin	50 % (v/v)

Agarosegel (1%)

Agarose	2 g
TAE Puffer	100 mL

in der Mikrowelle aufkochen

Ethidiumbromid Färbelösung

Ethidiumbromid	0.1 mL
H ₂ O	100 mL

Falls erforderlich, wurden mit Hilfe des UV-Tisches auch gewünschte DNA-Fragmente aus dem Gel mittels Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden daraufhin gewogen und mit dem QIAquick Gel-Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verarbeitet, um die enthaltenen DNA-Fragmente zu extrahieren.

2.3.6 DNA Konzentrationsbestimmung

Das Nanodrop ND1000 Spektrometer (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) wurde für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA Lösungen eingesetzt. Nach den Vorgaben des Herstellers wurden dabei die Absorptionen von 2 µL einer Lösung bei 260 und 280 nm vermessen. Proteinfreie Lösungen weisen dabei einen Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ von 1.8 bis 2 auf, dies entspricht einer idealen Reinheit der DNA in Lösung. Die Absorption bei 260 nm kann dabei zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht hier ca. 50 µg/mL doppelsträngiger DNA.

2.3.7 Ligation von DNA

Die Ligation von zuvor mit Restriktionsenzymen gespaltener DNA wurde mittels des Rapid DNA Ligation-Kits (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland) durchgeführt. Das Ligations-Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein typischer Ligationsansatz bestand dabei aus den entsprechenden Mengen DNA-Ligase, Ligasepuffer, sowie Vektor und Insert. Insert und Vektor wurden im Verhältnis 3:1 für die Ligation eingesetzt. Alternativ zu den Angaben des Herstellers wurde, sofern nötig, die Ligation über Nacht bei 4-17°C durchgeführt.

2.3.8 Herstellung von kompetenten Zellen

Für die Transformation von *E. coli* wurden zunächst kompetente Zellen benötigt. Es wurden sowohl chemo- als auch elektrokompente Zellen eingesetzt. Für die Präparation kompetenter Zellen wurde zunächst eine Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes angesetzt. Mit dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag 50-100 mL einer über-Tag-Kultur im Verhältnis 1:100 inokuliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Schikane-Erlenmeyerkolben bei 200 rpm und 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8. Nach dem Abfüllen in Falcongefäße wurden die Kulturen zunächst 10 min auf Eis gekühlt. Die Kulturen wurden dann für 5 min bei 3900 rpm bei 4 °C in der Megafuge 1.0R (Thermo Fisher Scientific) sedimentiert und zwei Waschschritten unterzogen. Bei chemokompetenten Zellen erfolgten diese Waschschriffe mittels eiskalter CaCl₂ Lösung (0,1 M CaCl₂, 10 %(w/v) Glycerol), bei elektrokompenten Zellen mit 10 %iger Glycerol Lösung. Mit jedem Waschschriff wurde die Kultur in jeweils der Hälfte des Volumens an Waschlösung des vorangegangenen Schritts aufgenommen. Das Resuspendieren erfolgte jeweils sehr vorsichtig, außerdem wurden die Zellen zwischen den Waschschriffen 15 min auf Eis inkubiert. Entsprechend der finalen OD₆₀₀ der Ausgangskultur (0,6 – 0,8) wurden die Zellen in 0,5-1 mL Waschlösung aufgenommen und in 50-100 µL Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Transformation von *P. aeruginosa* konnte ebenfalls durch die Verwendung von elektrokompenten Zellen erfolgen. Für die Präparation von kompetenten *P. aeruginosa* Zellen (verändert nach Choi *et al.*, 2006) wurden LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum mit *P. aeruginosa* Zellen des gewünschten

Stammes aus einer Glycerinkultur inokuliert. Nach der Kultivierung bei 37 °C über Nacht sollte eine große Zellmenge zur Verfügung stehen. Dafür war im Allgemeinen die Inokulierung mehrerer Platten nötig. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit einer sterilen Impföse vorsichtig von der Platte abgestrichen und in 1 mL 0,3 M steriler, eiskalter Saccharose-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 16.100 x g sedimentiert. Die Zellen wurden noch zwei weiteren Waschschritten mit je 1 mL Saccharoselösung unterzogen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Zellen in 500 µL Waschlösung aufgenommen und in 50 µL Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.9 Transformation und Biparental Mating

Die Transformation von chemokompetenten *E. coli* Stellar Zellen (Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Selbst erzeugte chemokompetente *E. coli* Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden vorsichtig mit 1-4 µL des entsprechenden Plasmids gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42 °C wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden anschließend sofort mit 450 µL vorgewärmtem LB-Medium gemischt und bei 37 °C und 800 rpm für 1 h schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels Glaskugeln zu 50 und 150 µL ausplattiert. Dabei enthielten die LB-Agar-Platten die nötigen Antibiotika zur Selektion. Nach der Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurden erfolgreich transformierte Kolonien ausgewählt.

Die Transformation von elektrokompetenten *E. coli* oder *P. aeruginosa* Zellen erfolgte in Elektroporationsküvetten in einem Elektroporator (Eppendorf, Deutschland). Dafür wurden 50 µL der Zellen vorsichtig aufgetaut und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden mit 1-2 µL Plasmid-DNA gemischt und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Die Küvette wurde vorsichtig getrocknet und in den Elektroporator gestellt. Die Elektroporation erfolgte dann bei 2,5 kV, 200 Ohm und 25 µF. Nach erfolgreicher Elektroporation nach ca. 5,5 ms wurden die Zellen zügig mit 450 µL LB aus der Küvette gespült und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte dann bei 37 °C und 800 rpm für 1 h im Thermoschüttler. Nach der Inkubation wurden die

Zellen zu 50 und 200 µL auf LB-Agar Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Die Transformation von *P. aeruginosa* Stämmen erfolgte auch mittels biparental Mating. Dies kam immer dann zum Einsatz, wenn es nicht möglich war, die Plasmid-DNA mittels Elektroporation in *P. aeruginosa* einzubringen. Für das biparental Mating wurde der *E. coli* Stamm ST18 genutzt (Thoma & Schobert, 2009). Dieser *E. coli* Stamm ist nicht in der Lage, 5-Aminolävulinsäure (ALA) herzustellen, was im späteren Verlauf zur Selektion zugunsten von *P. aeruginosa* genutzt werden kann, ohne dabei auf Antibiotika angewiesen zu sein. *E. coli* ST18 wurde dazu mit dem in *P. aeruginosa* einzubringenden Plasmid transformiert. Mit dem transformierten *E. coli* ST18 Stamm wurde eine Übernachtskultur inokuliert. Sowohl bei Transformation als auch Selektion musste darauf geachtet werden, dass stets ALA (75 µg/mL) im Medium und in den Platten vorhanden ist. Anschließend wurden 1 mL *E. coli* ST18 mit 100 µL einer *P. aeruginosa* Übernachtskultur gemischt und bei 16.100 x g für 2 min zentrifugiert. Die Bakterienmischung wurde in 100 µL LB-ALA resuspendiert und vorsichtig auf eine Agarplatte getropft. Der Tropfen wurde für 1 h bei RT getrocknet und anschließend für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Bakterientropfen mit einer Impföse vorsichtig abgestrichen und auf neue Platten ohne ALA, jedoch aber mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion positiver *P. aeruginosa* Klone als Vereinzelungsausstrich übertragen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Sicherstellung der Selektion positiver Klone erfolgten weitere Vereinzelungsausstriche, bevor die erhaltenen Transformanten bezüglich ihrer Eigenschaften untersucht wurden.

2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden 4 mL einer Übernachtskultur von plasmid-enthaltenden *E. coli* bei 16.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mittels mi-Plasmid Miniprep Kit (Metabion AG, Planegg/Steinkirchen, Deutschland) aufgeschlossen und die DNA entsprechend den Herstellerangaben gereinigt (verändert nach Birnboim & Doly, 1979).

2.3.11 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte auf Korrektheit der Sequenz wurden DNA-Sequenzierungen durchgeführt. Dies geschah durch die Firmen GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) und SeqLab Sequence Laboratories GmbH (Göttingen, Deutschland). Die Proben wurden zuvor mittels Plasmidpräparation vorbereitet. Die Sequenzen wurden durch die Softwares Lasergene (DNA Star, Madison, USA) oder SnapGene (GSL Biotech LLC, Chicago, USA) ausgewertet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Produktion von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

NirN aus *P. aeruginosa* wurde rekombinant im *E. coli* Stamm BL21 (DE3), wie von Nicke (2013) beschrieben, hergestellt. Dabei wurde *E. coli* in zwei Schritten mit dem Expressionsvektor pET22bStreplI*nirN* und anschließend mit pEC86 transformiert, um die aerobe Produktion der Cytochrom *c* Maturations Maschinerie in *E. coli* und damit den Einbau von Häm *c* in die NirN zu ermöglichen, sowie die Ausbeuten zu erhöhen (Londer, 2011). Eine Vorkultur in LB-Medium wurde mit einer Kolonie inokuliert und ü.N. bei 37 °C bei 180 rpm kultiviert. Die Hauptkultur wurde in Autoinduktionsmedium nach Studier (2005) mit zusätzlich 200 µM ALA und 500 µL FeSO₄ (14 mg/mL) angesetzt. Dabei wurde 1 Liter Medium in 2 L Schikanekolben 1:100 inokuliert. Die Kultur wurde zunächst 4 h bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, danach wurde die Temperatur auf 25 °C herabgesetzt. Es wurde anschließend 24 h bei 140 rpm weiter inkubiert. Danach erfolgte die Ernte der Bakterien.

Alternativ erfolgte die Hauptkultur für die Produktion von NirN auch in LB-Medium mit 200 µM ALA und der Zugabe von 500 µL FeSO₄ (14 mg/mL). Dabei wurde *E. coli* bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert, bevor die Proteinproduktion mit 500 µM IPTG induziert wurde.

Die Nitritreduktase aus *P. aeruginosa* wurde auch in ihrer semi apo Form (NirS_{s.a.}, ohne gebundenen Häm *d*₁ Kofaktor) benötigt. Sie wurde dafür ebenfalls rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die Kultivierung erfolgte analog zur Produktion

von NirN. *E. coli* BL21 DE3 wurde dabei mit pET22b*nirS* als Expressionsvektor transformiert.

Die Produktion von NirF erfolgte ebenfalls rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3), wie von Nicke (2013) beschrieben. Dafür wurde NirF aus *Dinoroseobacter shibae* verwendet. Als Expressionsvektor diente pET22b*nirFD.s.PCSS*StreptII. Zunächst wurde eine *E. coli* Vorkultur ü.N. bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Für die Hauptkultur wurde TB-Medium verwendet. Es wurde 1:100 mit der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Proteinproduktion wurde durch Zugabe von 50 µM IPTG induziert und die Temperatur wurde auf 17 °C herabgesetzt. Die Kultivierung erfolgte dann für weitere 24 h bei 180 rpm.

2.4.2 Anaerobe Kultivierung von *P. aeruginosa*

Für die Herstellung von nativer holo Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase (Nir_{WT} oder Nir_{ΔN}) wurden jeweils der *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp bzw. der *P. aeruginosa* PAO1 Stamm RM361 (*nirN::tet*) verwendet (Kawasaki *et al.*, 1997). Die Kultivierung von *P. aeruginosa* fand dabei unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von 75 mM Nitrat und 75 µM ALA statt, um die Denitrifikation und damit die Produktion von Nir_{WT} mit gebundenem Häm *d*₁ oder der Nir_{ΔN} mit Dihydrohäm *d*₁ zu begünstigen. Für die Kultivierung wurde AB-Medium verwendet (verändert nach Heydorn *et al.*, 2000). Hierzu wurde *P. aeruginosa* zunächst auf einer LB-Agar Platte kultiviert, bevor von der Platte eine aerobe 50 mL Übernachtkultur in LB-Medium inokuliert wurde. Mittels dieser Vorkultur wurden am nächsten Tag 5 L AB-Medium 1:100 inokuliert. Die Komponenten des AB-Mediums wurden immer direkt vor der Kultivierung gemischt und erst nach Zugabe aller Komponenten in anaeroben Flaschen mit *P. aeruginosa* inokuliert. Die anaeroben Flaschen wurden mit Septum und Deckel verschlossen und bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Nach 24 h wurden die Kulturen sedimentiert.

2.4.3 Zellernte

Die Zellernte der *E. coli* und *P. aeruginosa* Zellen nach vollendeter Proteinproduktion erfolgte bei 3.000 x g und 4 °C. Die *E. coli* Zellen wurden dabei für 25 min zentrifugiert, *P. aeruginosa* für 40 min. Nach der Zentrifugation wurde

der Medienüberstand entfernt, und die Zellen wurden in Puffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) im Verhältnis 1:3 resuspendiert. Die Zellen wurden in Falcongefäße überführt und bis zum Aufschluss bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Zellaufschluss zur Extraktion der Zielproteine

Nach dem Auftauen wurden die geernteten Zellen mittels French Press aufgeschlossen. Nach der Behandlung mit Nuklease (25 U/mL) wurden die Zellen in zwei Passagen durch die French Press lysiert, um eine hohe Proteinausbeute zu gewährleisten. Die French Press Zelle wurde hierfür auf 4 °C gekühlt, und die Proben wurden auf Eis gehalten. Während der Passage wurden die Zellen ca. 19.200 p.s.i. ausgesetzt. Die löslichen Proteine wurden bei 235.000 x g und 4 °C für 60 min von den Zelltrümmern abgetrennt und dann für die Proteinreinigung eingesetzt.

Alternativ erfolgte der Zellaufschluss mittels Fast Prep (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). Die Zellen wurden nach der Nukleasebehandlung auf 15 mL Falcongefäße verteilt, die mit 5 g Zirkonia Beads (0,1 mM Durchmesser) befüllt waren. Die Zellen wurden mittels Vortexer mit den Beads gemischt. Der Aufschluss erfolgte dann in zwei Durchgängen im TeenPrep Aufsatz für je 40 s und 6 m/s. Die Zirkonia Beads wurden für 2 min bei 4 °C und 3.000 x g von den löslichen Proteinen und Zellbestandteilen abgetrennt. Dann erfolgte die Abtrennung der Zellbestandteile von den löslichen Proteinen bei 235.000 x g und 4 °C für 60 min.

2.4.5 Periplasmaaufschluss

Um spezifisch nur die Proteine des Periplasmas zu extrahieren wurde ggf. ein Periplasmaaufschluss eingesetzt. Dafür wurden die Zellen nach der Zellernte und Resuspension in Proteinpuffer nicht direkt eingefroren, sondern je nach Maßstab des Aufschlusses erneut in Falcon (4.000 x g, 10 min, 4 °C) oder Eppendorf Gefäßen (16.900 x g, 2 min, 4 °C) zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellen wurden anschließend in Periplasmaaufschlusspuffer mit Polymyxin B 1:3 resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen unter Bewegung auf dem Rollinkubator für 2 h bei 4 °C aufgeschlossen. Die periplasmatische Fraktion wurde mittels Ultrazentrifuge (235.000 x g, 1 h, 4 °C) oder Kühlzentrifuge (16.900 x g, 10 min,

4 °C) von den Zelltrümmern abgetrennt. Je nach Zweck des Aufschlusses wurde der periplasmatische Extrakt entweder direkt im UV-Vis-Spektrophotometer (2.5.1) vermessen oder für die Strep-Tag-Affinitätschromatographie (2.4.6) eingesetzt.

Periplasmaaufschlusspuffer (verändert nach Bali *et al.*, 2010)

Tris HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Polymyxin B sulfat	2 mg/mL
Nuklease	25 U/mL

2.4.6 Strep-Tag-Affinitätschromatographie

Die Strep-getaggten Proteine NirN und NirF wurden mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei wurde Strep-Tactin-Matrix der Firma IBA (Göttingen, Deutschland) verwendet. Das Reinigungsprotokoll wurde anhand der Herstellervorgaben abgeändert. Die Strep-Tactin-Matrix musste zunächst äquilibriert werden, was durch mindestens 5 Säulenvolumen des entsprechenden Proteinpuffers erfolgte. Während der Vorbereitung der Säule wurde der zellfreie Extrakt mit 200 µL Avidin-Lösung (2 mg / mL) für 20 min behandelt, dies diente dem Blockieren von unspezifisch bindenden biotinylierten Proteinen. Der Extrakt wurde vollständig auf die Säule aufgetragen. Die Matrix wurde daraufhin mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution der Zielproteine erfolgte mittels 5-10 Säulenvolumen Elutionspuffer. Bei NirN wurde die Elution auch fortgesetzt, bis die Säule die rote Farbe von NirN vollständig verloren hatte. Jeder Schritt der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die Säule wurde mit HABA nach den Herstellerangaben regeneriert, jedoch wurde HABA durch Waschen mit 0,5 M NaOH entfernt. Die gereinigten Proteine wurden nach einem Pufferwechsel direkt eingesetzt oder bei -80°C gelagert. Für manche Anwendungen war es nötig, die Proteine in einer anschließenden Größenausschlusschromatographie weiter zu reinigen. Insbesondere für NirF empfahl sich ein weiterer Reinigungsschritt, da das Protein nach der Strep-Tag-Affinitätschromatographie noch durch das Chaperon DnaK verunreinigt war.

Proteinpuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Waschpuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Elutionspuffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Desthiobiotin	5 mM

Regeneration der Matrix

HABA (IBA) (1:5 in ddH₂O)

bzw. NaOH 0,5 M

2.4.7 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde für die Reinigung der nativen Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase in ihrer holo Form aus *P. aeruginosa* und in ihrer semi apo Form aus *E. coli* genutzt. Sie stellt den ersten Schritt der Reinigung dar und wurde nach Parr *et al.* (1976) verändert. Für die Reinigung wurde das Äkta Purifier System der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) sowie eine Q-Sepharose FastFlow-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) mit 15 mL Säulenvolumen verwendet. Diese kann mit einer Flussrate von 1-2 mL/min betrieben werden. Puffer und Lösungen wurden stets durch Filtration (0,45 µm Porengröße) und Entgasen vorbereitet. Die Chromatographie wurde bei 17 °C durchgeführt. Der zellfreie *P. aeruginosa* Extrakt musste für die Chromatographie entsprechend vorbereitet werden. Dazu wurde der Extrakt direkt nach dem Aufschluss zunächst ü.N. gegen 5 L Puffer A bei 4 °C dialysiert. So wurde sichergestellt, dass alle Proteinmoleküle bei einem bestimmten pH-Wert und somit mit einer definierten Ladung vorliegen, um an den Ionenaustauscher binden zu können. Der Extrakt wurde außerdem nach der Dialyse für 1 h bei 4°C und 235.000 x g zentrifugiert. Die Chromatographie wurde mittels des UV/Vis

Detektors des Äkta-Systems verfolgt. Dabei wurde genutzt, dass die Cytochrom *cd₁* Nitritreduktase nicht nur eine Proteinabsorption aufweist (280 nm), sondern auch die Absorption ihrer Häm c (410 nm) und Häm *d₁* (640) bzw. Dihydrohäm *d₁* (632 nm) Kofaktoren aufgezeichnet werden kann. Der Extrakt wurde dann mittels der Sample Pump der Äkta direkt auf die mit Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen (2 mL / min Flussgeschwindigkeit und Druck von maximal 0,55 MPa). Die Säule wurde anschließend mit Puffer A für mindestens 3 Säulenvolumen gewaschen, dabei wurde ein Großteil der Proteine, die in ihren Ladungseigenschaften nicht der Nitritreduktase entsprechen, entfernt. Auf diesen Waschschrift folgte die Elution der gebundenen Proteine mittels eines linearen NaCl Gradienten. Dieser Gradient bestand in einem Anstieg der Konzentration von Puffer B auf 25 % in 7 Säulenvolumen. Die Elution der Nitritreduktase wurde durch Absorptionsmessung verfolgt und die entsprechenden Fraktionen aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule mit 100 % Puffer B gewaschen (3 SV) und anschließend wieder mit Puffer A äquilibriert (2 SV). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf das enthaltene NirS Protein untersucht. Die NirS enthaltenden Fraktionen wurden dann vereinigt und die Kationentauscherchromatographie vorbereitet.

Puffer A

Tris-HCl, pH 8.0 25 mM

Puffer B

Tris-HCl, pH 8.0 25 mM

NaCl 1M

Das Äkta-System und auch die Säulen wurden stets in 20 %igem (v/v) Ethanol gelagert. Bevor das System jedoch mit Ethanol gespült wurde, mussten Pufferlösungen durch Spülen mit ddH₂O entfernt werden. Auch Ethanol und ddH₂O wurden filtriert und entgast. Ein typisches *clean in place* (CIP) Programm bestand aus Spülen des Systems und der Säulen mit je 2 SV Wasser, dann 2 SV Ethanol. Vor einem erneuten Lauf wurde das System und die Säule mit 2 SV ddH₂O und anschließend 2 SV Puffer A vorbereitet.

2.4.8 Kationenaustauschchromatographie

Für die Kationenaustauschchromatographie wurde eine SP-Sepharose FastFlow-Säule (GE Healthcare, Münschen, Deutschland) mit einem Säulenvolumen von 10 mL verwendet. Auch diese Säule wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1-2 mL / min und einem Druck von maximal 0,55 MPa betrieben. Die vereinigten Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mussten für die Kationenaustauschchromatographie vorbereitet werden. Dafür wurde die Proteinlösung ü.N gegen 5 L Puffer C dialysiert. Nach dem Auftragen der Proteinlösung (Sample Pump, 1-2 mL / min) wurde die Säule für 2 SV mit Puffer C gewaschen. Die anschließende Elution erfolgte in diesem Fall mittels eines Stufengradienten. Die Säule wurde dabei für 5 SV mit 25 % Puffer D gespült, anschließend mit 3 SV 100 % Puffer D gewaschen und auf Puffer C äquilibriert (3 SV). Die NirS haltigen Fraktionen wurden für die Häm d_1 Extraktion aus der Nitritreduktase direkt konzentriert und in 500 µl Aliquoten mit 3-4 mg / mL NirS bei -80 °C eingefroren. Für andere Anwendungen war ein weiterer Reinigungsschritt, wie eine Größenausschlusschromatographie, nötig. Die Reinigung und Vorbeitung der Säule für einen erneuten Lauf verlief analog zur Anionentauschersäule.

Puffer C

Phosphatpuffer, pH 6.4 25 mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) (Gomori, 2010)

Puffer D

Phosphatpuffer, pH 6.4 25 mM (Gomori, 2010)

NaCl 1 M

2.4.9 Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) (Lottspeich & Engels, 2012) wurde als weiterer Reinigungsschritt nach der Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Desweiteren wurden mittels der GPC Kofaktor-Bindungsstudien durchgeführt. Für die GPC wurden Superdex 75 und Superdex 200 Säulen mit 24 mL Säulenvolumen (10/300) der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) verwendet.

Die in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagerten Säulen wurden für die Chromatographie mittels 2 SV H₂O und 2 SV des entsprechenden Puffers (4 °C) vorbereitet. Dabei wurde eine Flussgeschwindigkeit von maximal 0,5 mL / min und ein Druck von 1,3 MPa eingehalten. Die Proben wurden ebenfalls für die Chromatographie vorbereitet. Dafür wurden die Proben konzentriert und in maximal 500 µL Puffer aufgenommen. Außerdem wurden die Proben für mindestens 10 min bei 16.100 x g, zentrifugiert um eventuell denaturiertes Protein abzutrennen. Die Proben wurden dann mittels eines 500 µL Kapillarloops auf die Säule aufgetragen. Während des Laufs wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt. Bei NirN und NirS wurde zusätzlich zu der Absorption bei 280 nm auch die bei 410 nm verfolgt. Bei NirS und NirN mit gebundenem Häm *d*₁ wurde weiterhin die Absorption bei 626 oder 642 nm verfolgt. Für einen rein analytischen Lauf wurde wesentlich weniger Protein verwendet als für einen präparativen Lauf. Für eine analytische GPC wurde zusätzlich ein 200 µL Kapillarloop für den Probenaufrag verwendet. Während der Chromatographie wurden die gewünschten Fraktionen anhand des Chromatogramms ausgewählt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und ankonzentriert. Das Ergebnis der Chromatographie wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Außerdem wurde die Säule mittels Standardproteinen (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) kalibriert, um die molekulare Masse der analysierten Proteine abschätzen zu können.

Nach dem Lauf wurde die Säule wieder mittels 2 SV H₂O und 2 SV 20 % (v/v) Ethanol auf die Lagerung vorbereitet. Die Säulen wurden in regelmäßigen Abständen mit 1-2 SV 0,5 M NaOH und mindestens 5 SV H₂O gereinigt, um die Akkumulation von Proteinresten im Säulenbett zu verhindern.

2.4.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) diente als Standard für die Messungen. Für die Bestimmung wurden je 1-5 µL Proteinlösung mit 250 µL Bradford Reagenz gemischt und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader durch Absorptionsmessung bei 595 nm, wobei Bradford Reagenz als Referenz eingesetzt wurde.

2.4.11 Konzentrieren und Pufferwechsel von Proteinlösungen

Das Konzentrieren von Proteinlösungen erfolgte durch Ultrafiltration in Vivaspin Zentrifugationskonzentratoren (Sartorius, Göttingen, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Es wurden Konzentratoren verschiedener molekularer Ausschlussgrößen (MWCO) verwendet. Für NirN und NirF wurde eine Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet, für NirS wurde auch eine Ausschlussgröße von 30 kDa verwendet.

Der Pufferwechsel kleinerer Volumina von Proteinlösungen wurde ebenfalls in Zentrifugationskonzentratoren durchgeführt. Dabei wurde das Protein zunächst ankonzentriert, dann in dem entsprechenden Puffer verdünnt und erneut ankonzentriert. Dies wurde bis zu drei Mal wiederholt, um sicherzustellen, dass der Pufferwechsel vollständig war.

Alternativ erfolgte der Pufferwechsel mittels Nap-10 Säulen (GE Healthcare, München, Deutschland). Die Säulen wurden nach Angaben des Herstellers für Pufferwechsel und Entsalzung von Proteinproben eingesetzt. Weiterhin erfolgte der Pufferwechsel großer Volumina auch durch die Verwendung von Dialyseschläuchen und Dialyse ü.N. gegen ein großes Volumen des gewünschten Puffers. Dabei wurde der Dialyseschlauch zunächst in dH₂O aufgekocht und im entsprechenden Proteinpuffer geschwenkt. Die Proteinlösung wurde eingefüllt und der Schlauch wurde sicher verschlossen. Der befüllte Dialyseschlauch wurde in 5 L Puffer gehängt und mittels eines Rührmagneten und einer Rührplatte über Nacht vorsichtig bewegt, um den Pufferaustausch zu ermöglichen.

2.4.12 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Abschätzung des Molekulargewichts von Proteinen und zur Bestimmung ihrer Reinheit wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Dabei werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts (M_r) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Trenn- und Sammelgel wurden nach Righetti (1990), wie unten beschrieben, gegossen. Dabei erhält man 12 %ige Trenn- und 6 %ige Sammelgele. Proben für die SDS-PAGE mussten entsprechend vorbereitet werden. Dazu wurden die Proben mit

2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min aufgeköcht. Vor dem Probenauftrag wurden die Proben bei 16.100 x g für 10 min zentrifugiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V für 45-50 min in SDS-Laufpuffer. Um das Molekulargewicht der Proteine nach vollendeter PAGE abschätzen zu können, wurde ein passender Proteinstandard verwendet (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Die Gele wurden zur Visualisierung der getrennten Proteine in Coomassie-Lösung für mindestens 30 min gefärbt. Danach wurden die Proteine mittels Entfärberlösung sichtbar gemacht, zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert und getrocknet.

Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Acrylamid 30 % (w/v)

Bisacrylamid 0.8 % (w/v)

12 %ige Trenngele (4 Stück)

Rotiphorese Gel 30	8 mL
0.4 % SDS (w/v) in 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	5 mL
ddH ₂ O	5.5 mL
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	200 µL
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	10 µL

6 %ige Sammelgele (4 Stück)

Rotiphorese Gel 30	2 mL
0.4 % SDS (w/v) in 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL
ddH ₂ O	5.5 mL
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	100 µL
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	10 µL

2x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl, pH 6.8	100 mM
Glycerin	40 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	2% (v/v)
SDS	3.2 % (w/v)
Bromphenolblau	0.2 % (w/v)

SDS-Laufpuffer

Tris-HCl, pH 8.8	50 mM
Glycin	385 mM
SDS	0.1 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung

Essigsäure	10 % (v/v)
Ethanol	30 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	0.25 (w/v)

in ddH₂O

Enfärber

Essigsäure	10 % (v/v)
Ethanol	30 % (v/v)

in ddH₂O

2.4.13 Westernblot

Durch den Westernblot (verändert nach Towbin *et al.*, 1979 und Gershoni & Palade, 1983). können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, werden dabei auf einer Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Merck Millipore, Billerica, USA) immobilisiert, wo sie durch spezifische Antikörper nachgewiesen und sichtbar gemacht werden. Der Transfer der Proteine auf die PVDF Membran nach vollendeter SDS-PAGE erfolgte mittels eines Transblot Turbo Gerätes (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Membran wurde zunächst durch Schwenken in Methanol (5 min) aktiviert und in Transferpuffer (10 min) äquilibriert. Auch das SDS-PA-Gel, welches die aufgetrennten Proteine enthält, wurde für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Vor dem Aufbau des semi-dry Blots in der Blotkassette wurden auch zwei Whatman Papiere mit Transferpuffer getränkt. Ein Whatman Papier wurde in der Blotkassette platziert, mit der PVDF-Membran, dem SDS-PA-Gel und einem weiteren Whatman Papier bedeckt. Die Kassette wurde unter leichtem Druck geschlossen. Die Proteine wurden bei 1 V und 25 mA für 12 min transferiert. Nach erfolgtem Transfer wurde der Blot abgebaut und die Membran aus der Kassette entfernt. Die Membran wurde daraufhin kurz gewässert. Um für die folgende spezifische Detektion der Proteine durch entsprechende Antikörper unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran kurz in

Methanol geschwenkt und anschließend für mindestens 2 h in Blockierlösung bei 4 °C blockiert. Die Blockierungslösung wurde durch Schwenken in Wasser entfernt, und die Membran wurde mit dem monoklonalen Primärantikörper (unverdünnt,) oder einem Strep-Tactin Konjugat (IBA, Göttingen, Deutschland), welche der spezifischen Bindung der Proteine dienen, für 1 h bei RT unter sanftem Schütteln inkubiert. Antikörper wurden in 25 mL TBS angesetzt. Das Strep-Tactin Konjugat wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Daran schlossen sich mehrere Waschschrte (3x 10 min TBS-T) an. In einem weiteren Inkubationsschritt wurde das Signal durch die spezifische Bindung des Primärantikörpers durch einen alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2500) verstärkt. Diese Inkubation fand ebenfalls für 1 h statt. Der Sekundärantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 25 mL TBS eingesetzt. Bei Inkubation mit Strep-Tactin-Konjugat entfiel dieser zweite Inkubationsschritt, da in diesem Fall der Primärantikörper direkt mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Weitere drei Waschschrte schlossen sich an (10 min, TBS-T). Für die Entwicklung des Blots war es nötig, dass die Membran zuvor in APB-Puffer äquilibriert wurde (25 mL). Für die Färbereaktion wurde eine Färbelösung aus 20 mL ABP und den Färbereagenzien NBT (132 µL) und BCIP (33 µL) angesetzt. Die Membran wurde bis zum Eintreten einer Färbung in der Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Die Membran wurde anschließend zum Abstoppen der Färbereaktion zügig gewässert und zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet.

Transferpuffer

Tris-HCl, pH 9.5	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	15 % (v/v)

TBS

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

TBS-T

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0.1 % (v/v)

Blockierungslösung

TBS mit Rinderserumalbumin Fraktion V 3 % (w/v)

APB

Tris-HCl, pH 9.5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

NBT

NBT in 70 % DMF	50 mg/mL
-----------------	----------

BCIP

BCIP in 100 % (v/v) DMF	50 mg/mL
-------------------------	----------

2.4.14 N-terminale Sequenzierung

Um die produzierten und gereinigten Proteine auf ihre Identität zu überprüfen, wurden sie N-terminal sequenziert und die erhaltene Sequenz mit Sequenzdatenbanken verglichen. Dafür wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteine wurden auf der Membran mittels Ponceau-S Lösung sichtbar gemacht, um die entsprechenden Proteinbanden auswählen und ausschneiden zu können. Dafür wurde die Membran zunächst 5 min mit der Ponceau-S Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Membran gewässert, um überschüssiges Ponceau zu entfernen. Die N-terminale Sequenzierung wurde freundlicherweise von Beate Jaschok-Kentner am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt.

Ponceau S-Lösung (5x)

Ponceau S	2 % (w/v)
Trichloressigsäure	1,84 M
Sulfosalicylsäure	1,2 M

2.4.15 Extraktion der Nitritreduktase Kofaktoren

Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 wurden aus Nir_{WT} bzw. Nir_{ΔN} extrahiert. Für eine Extraktion wurden 500 µl 3-4 mg / mL Nitritreduktase eingesetzt. Das Protein wurde zunächst durch Zugabe von 5 – 10 µL konzentrierter HCl denaturiert. Der

enthaltene nicht-kovalent gebundene Häm d_1 Kofaktor wurde dabei aus dem Protein gelöst. Nach Zugabe von 500 μ L Ethylacetat wurde die Probe für 1 – 2 min auf einem Vortexer gemischt. Dabei trat der Häm d_1 Kofaktor in die organische Phase über. Die Probe wurde dann für 3 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Ein 1,5 mL Eppendorfgefäß wurde mit einem ca. 3 cm langen Flachbodenglas bestückt. Nach der Zentrifugation wurde die organische Phase der Probe vorsichtig abgenommen und in das Flachbodenglas überführt. Das Ethylacetat wurde anschließend in einer Speed-Vac (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) im Modus für Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck 12-15 min verdampft. So wurden getrocknetes Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 erhalten, welche für den NirN Aktivitätsassay, bzw. für Bindungs- und Transferstudien eingesetzt wurden. Jedoch wurde nicht bei jeder Durchführung der Extraktion eine vollständige Entfernung des Kofaktors erreicht. In diesen Fällen wurden erneut 1-5 μ L der 10 %igen HCl hinzugegeben und die Extraktion wiederholt. Für die Bestimmung der genauen Masse der Kofaktoren wurden die NirS Proteine vor der Extraktion mittels NAP Säulen in deionisiertes Wasser überführt. Außerdem wurde in diesem Fall nur die kleinstmögliche Menge HCl (1 μ L einer 10 %igen Lösung) für die Extraktion eingesetzt. Die getrockneten Kofaktoren wurden bei - 20 °C maximal 2 Tage gelagert.

2.4.16 Kofaktor Bindungsstudien

Die Bindung von Häm d_1 bzw. Dihydrohäm d_1 an verschiedene Proteine wurde untersucht. Dafür wurden die wie in 2.4.16 extrahierten und getrockneten Kofaktoren aus 500 μ L 2-3 mg / mL der NirS Proteine in 150 – 500 μ L Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) aufgenommen, und NirN wurde mit einer Endkonzentration von 34 μ M hinzugeführt. Alternativ wurden die getrockneten Kofaktoren in Proteinpuffer aufgenommen, der bereits das entsprechende Protein enthielt. Häm d_1 bzw. Dihydrohäm d_1 extrahiert aus 100-500 μ L 2-3 mg/mL NirS_{WT} bzw. NirS_{ΔN} wurde dabei direkt in Proteinpuffer gelöst, der bereits 38 μ M NirF enthielt. Die Bindung der Kofaktoren an die Proteine wurde mittels UV-Vis Spektroskopie, wie in 2.5.1 beschrieben, verfolgt und aufgezeichnet.

2.4.17 Anaerobe Arbeiten

Für anaerobe Arbeiten wurde eine Vinyl Glove Box (Coy Laboratories, Grass Lake, USA) genutzt, welche mit einem Spektrophotometer (V-650, Jasco, Groß Umstadt, Deutschland) ausgestattet war. Materialien und Puffer wurden anaerobisiert verwendet. Schraubflaschen mit Butylsepten dienten der Anaerobisierung von Lösungen und Puffern. Die Anaerobisierung wurde an der Anaerobisierungsanlage mittels Zyklen von Vakuum und Stickstoffbegasung durchgeführt. 100 mL Puffer wurden dabei für mindestens 2 h in einminütigen Zyklusintervallen anaerobisiert. Proteine wurden vor der Verwendung in das Zelt eingeschleust und ggf. für mindestens 30 min mit geöffnetem Gefäß in kleinen Mengen stehengelassen.

2.4.18 Enzymaktivitätsassay für NirN

Um die enzymatische Aktivität von NirN mit Dihydrohäm d_1 als Substrat zu zeigen, wurde eine Lösung des extrahierten Dihydrohäm d_1 in Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) von 15 μ M oder 20 μ M hergestellt. Die Lösung wurde direkt in eine Quarzküvette (Hellma Analytics, Müllheim, Germany) gefüllt. Das Photometer wurde dann so eingestellt, dass selbsttätig Spektren im Bereich von 525-725 nm aufgenommen wurden. Jede Messung dauerte dabei ca. 15 s. NirN wurde hinzugegeben (Endkonzentration 20 μ M, Endvolumen 150 μ L), und der zeitliche Verlauf der Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 wurde mittels der Verschiebung des charakteristischen Absorptionsmaximums der Kofaktoren verfolgt. Für die vollständige Oxidation des Reaktionsprodukts wurden einige Körnchen Natriumpersulfat in die Küvette gegeben und durch vorsichtiges auf und ab Pipettieren mit der Proteinlösung gemischt. Um die Reduktion des NirN gebundenen Häm c Kofaktors im Verlauf der Reaktion besser beobachten zu können, wurde der Enzymaktivitätsassay auch unter Sauerstoffausschluss in der Glove Box (2.4.18) durchgeführt. Dabei wurde das getrocknete Substrat erst in der Glove Box in anaerobem Puffer aufgenommen. Für den anschließenden Transfer des Reaktionsprodukts auf die semi apo NirS wurde das Protein mit einer Endkonzentration von 20 μ M zugegeben, und der Transfer wurde erneut mittels UV-Vis Spektrophotometer beobachtet.

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 UV/Vis Spektroskopie

Für die Aufnahme von UV/Vis Absorptionsspektren der in dieser Arbeit hergestellten Proteine und Extrakte, sowie zur Beobachtung von Aktivitätsassays und Bindungsversuchen, wurde das Spektrometer V-650 der Firma Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Proteinproben wurden in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke vermessen. Reduzierte Proben wurden durch Zugabe einiger Körnchen Natriumdithionit oder Natriumascorbat erhalten.

2.5.2 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Für die Charakterisierung der in der Nir_{SWT} oder Nir_{S_{ΔN}} gebundenen Häm *d₁* und Dihydrohäm *d₁* Kofaktoren wurde die Resonanz-Raman-Spektroskopie verwendet. Die Versuche wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hildebrandt an der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Für die Aufnahme der Raman-Spektren wurde das konfokale Raman Spektrometer Lab Ram HR-800 (Jobin Yvon, Edison, USA) verwendet. Die Probe wurde mit einem He-Cd Laser (Soliton, Gilching, Deutschland) bei 442 nm angeregt, indem der Laser auf einen Probenbereich von 2 µm Durchmesser gerichtet wurde (1 mW auf der Probe). Die Probe wurde dabei durch einen Cryostat (Cryostage THMS600 der Firma Linkham, Tadworth, UK) konstant auf 80 K gekühlt. Raman-Verschiebungen wurden auf eine Genauigkeit von 0,5 cm⁻¹ mittels Toluol als externem Standard kalibriert. Die Spektren wurden durch Abzug des Hintergrunds korrigiert. Ein Spektrum der vollständig oxidierten Nir_{S_{s.a.}} bei 80 K lässt sie nicht direkt aufnehmen, da das Enzym bei dieser Temperatur Photoreduktion erfährt. Das Spektrum der oxidierten Probe wurde daher durch den Abzug des Spektrums der vollständig durch Dithionit-reduzierten Nir_{S_{s.a.}} von dem Spektrum der hauptsächlich oxidierten Nir_{S_{s.a.}} erhalten.

2.6 HPLC

Tetrapyrrole wie Häm *d₁* und Dihydrohäm *d₁* können über eine HPLC getrennt werden. Dabei kam eine Jasco 2000 Anlage (Groß-Umstadt, Deutschland) mit UV- und Fluoreszenzdetektor zum Einsatz. Die Proben wurden nach 2.4.15

extrahiert, dann in Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) aufgenommen. Die Injektion der Proben erfolgte automatisiert, es wurden 50 μ L Probe injiziert. Für die Trennung von Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 wurde eine Equisil BDS C18-2 Säule der Firma Dr. Maisch (Ammerbruch-Entringen, Deutschland) verwendet. Dabei wurde die Anlage mit 0,5 mL/min Flussgeschwindigkeit betrieben. Während der Elution wurde die Absorption im Bereich von 200-650 nm aufgezeichnet. Außerdem wurde die Fluoreszenz (Anregung 409 nm, Emission 630 nm) detektiert. Das verwendete HPLC-Programm ist in Tabelle 2.10 dargestellt.

Tab. 2.10 HPLC Programm* für die Detektion von Dihydrohäm d_1 und Häm d_1

Zeit	1 M Ammoniumacetat pH 5.2 (%)	Methanol (%)	Acetonitril (%)
0	80	10	10
25	60	30	10
40	0	90	10
60	0	90	10
65	80	10	10
80	80	10	10

*Programm analog Methode Mela_Heme_Gradient-Nr4

2.7 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der genauen Massen der aus den NirS Proteinen extrahierten Kofaktoren wurde mittels High-Resolution-Electrospray-Ionization-MS durchgeführt. Dabei kam eine LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) zum Einsatz. Die Messungen wurden freundlicherweise von Martin Hoffmann (Institut für Anorganische und Analytische Chemie) und Ulrich Papke (Institut für Organische Chemie) an der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt.

2.8 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometrie (ICP-MS)

Da der Extinktionskoeffizient des zum ersten Mal gereinigten Dihydrohäm d_1 unbekannt war, wurde er mittels ICP-MS bestimmt. 500 μ L einer Probe von NirS_{WT} bzw. NirS _{Δ N} mit einer Konzentration von 3 mg/mL wurden nach 2.4.15 extrahiert. Jeweils genau die Hälfte dieser Proben (Kofaktor aus 250 μ L 3 mg/mL NirS) wurden zurückbehalten, um die in der ICP-MS gemessene Eisen-Konzentration mit einer bestimmten Dihydrohäm d_1 Absorption korrelieren zu

können. Dafür wurden die Absorption der zurückbehaltenen Proben von Dihydrohäm d_1 bei 672 nm bzw. von Häm d_1 bei 682 nm in 150 μ L Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) bestimmt. Dies war nötig, damit sich der Extinktionskoeffizient auf den Puffer und pH-Wert bezog, in dem die Proteine vorlagen. Das aus NirS_{WT} extrahierte Häm d_1 wurde als Referenz vermessen, da dessen Extinktionskoeffizient bei mehreren pH-Werten bekannt war. Während der ICP-MS Messung wurde genutzt, dass die extrahierten Kofaktoren ein zentrales Eisen-Atom enthalten. Die Bestimmung der Konzentration der Kofaktoren erfolgte somit über die Bestimmung der absoluten Eisen-Konzentration der anderen Hälfte (Kofaktor aus 250 μ L 3 mg/mL NirS) der extrahierten Kofaktorprobe. Die ICP-MS Messungen von Eisen wurden durch die Firma Currenta (Leverkusen, Deutschland) durchgeführt.

2.9 Protein Film Voltammetrie

Die Redoxpotentiale des Häm c Kofaktors von NirN, sowie von Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 bzw. der an NirN gebundenen Kofaktoren wurden mittels zyklischer Voltammetrie bestimmt. Die Interaktion von NirN mit einer Edge Plane Pyrolytic Graphite Elektrode wurde dabei ausgenutzt, man spricht daher von Protein Film Voltammetrie. NirN und die Kofaktoren wurden für die Messungen jeweils frisch gereinigt bzw. extrahiert. NirN wurde mit einer Konzentration von ca. 130 μ M in Proteinpuffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) eingesetzt. Die Messungen fanden in HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) statt, der in einen Rundkolben gefüllt war. Während der Messungen wurden die Elektroden in den Puffer gehängt, der ständig mit Stickstoff durchsetzt wurde, um Sauerstoff auszuschließen. Als Referenzelektrode wurde eine Silberchlorid-elektrode (Ag/AgCl sat. KCl) verwendet, als Gegenelektrode diente ein Platindraht. Während der Versuchsdurchführung wurde zunächst NirN, Häm d_1 oder Dihydrohäm d_1 mit der Arbeitselektrode für 4 s inkubiert. Wurde NirN mit Substrat vermessen, so wurde NirN zunächst mit Substrat für 5 min inkubiert, bevor das Protein auf die Elektrode aufgebracht wurde. Die Messungen wurden freundlicherweise am Helmholtzzentrum für Umweltforschung (Leipzig, Deutschland) in der Gruppe von Dr. Falk Harnisch durch Dr. Luis Rosa durchgeführt.

2.10 Kristallisation von Proteinen

Sowohl für NirN als auch für NirF wurden mehrere Kristallisationsversuche durchgeführt. Dabei wurden beide Proteine in ihrer StrepII-getaggten Variante mit ca. 10 - 11 mg / mL Konzentration in Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) eingesetzt. Die Proteine wurden außerdem einer GPC-Reinigung in Proteinpuffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) unterzogen. Die Kristallisationsversuche fanden am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) in Kooperation mit Dr. Jörn Kraußze statt. Es wurden sowohl Screens mittels der Sitting Drop Vapor Diffusion Methode als auch mittels Hanging Drop Vapor Diffusion Methode pipettiert (McRee, 1999; Rhodes, 2006). Die Screens wurden mittels Pipettierroboter Honeybee 961 (Zinnsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) im Verhältnis 1:1 von Protein zu Kristallisationsbedingung pipettiert. Die für NirF und NirN verwendeten Kristallisationskits sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Das Kristallwachstum wurde über eine längere Zeitspanne beobachtet, teilweise kam dabei das Kristallhotel Rock Imager (Formulatrix, Bedford, USA) zum Einsatz, welches in vorprogrammierten Zeitabständen selbsttätig das Kristallwachstum fotografiert. Mittels Hanging Vapor Drop Diffusion Methode wurden die Bedingung 34 des JCSG Core III Screens und die Bedingung 38 des JCSG Core IV Screens für NirF per Hand verfeinert. Für die Bedingung 34 des JCSG Core III Screens wurden die pH-Werte 6,0, 7,0 und 8,0 sowie die Citratkonzentrationen 0,5, 1, 1,5 und 2 M, getestet. Für die Bedingung 38 des JCSG Core IV Screens wurden die pH-Werte 6,5, 7,5 und 8,5 sowie die Ammoniumsulfatkonzentrationen 0,8, 1,26, 2,0, sowie 3,2 M getestet.

2.11 Bioinformatische Methoden

Die in der Arbeit verwendeten bioinformatischen Programme sind in Tabelle 2.11 dargestellt.

Tab. 2.11: Bioinformatische Programme

Programm	Zweck	Quelle
DNA Star Lasergene	DNA Analyse & Manipulation	DNASTAR Inc.
Snapgene	DNA Analyse & Manipulation	GSL Biotech LLC
Signal P	Proteinsignalsequenz Bestimmung	Petersen <i>et al.</i> (2011)
Zhang Lab iTasser	Proteinstruktur Vorhersage	Roy <i>et al.</i> (2010), Zhang (2008)
Zhang Lab Coach	Protein-Cofaktor Bindungsanalyse	Yang <i>et al.</i> (2013)
Zhang Lab Cofactor	Protein-Cofaktor Bindungsanalyse	Roy <i>et al.</i> (2012) Yang <i>et al.</i> (2013)
Phyre 2	Proteinstruktur Vorhersage	Kelley & Sternberg (2011)
Pymol	Proteinstruktur Darstellung	Schrödinger, LLC
NCBI	Datenbank	U.S. National Library of Medicine
Pseudomonas.com	Datenbank	Winsor <i>et al.</i> (2001)
RCSB PDB (rcsb.org)	Datenbank	Berman <i>et al.</i> (2000)
Clustal Omega	Sequenz Alignment	Sievers <i>et al.</i> (2011)
Uniprot	Sequenz Alignment	The Uniprot Consortium (2015)
ExPASy	Extinktionskoeffizienten	Artimo <i>et al.</i> (2012)

3 Ergebnisse und Diskussion

In vorangegangenen Arbeiten wurden erste Hinweise auf einen veränderten Kofaktorgehalt der Nitritreduktase NirS in einer *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante (*P. aeruginosa* RM361) im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 gefunden (Nicke *et al.*, 2013). Die Arbeiten von Nicke *et al.* bestanden in der UV-Vis spektroskopischen Untersuchung von periplasmatischen Extrakten verschiedener *P. aeruginosa* Stämme. Es wurde gezeigt, dass das UV-Vis Spektrum eines periplasmatischen Extrakts der *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante (RM361) deutliche Unterschiede im Vergleich zum Spektrum des periplasmatischen Extrakts eines *P. aeruginosa* Wildtyp Stammes aufweist. Dabei war das charakteristische Häm d_1 Signal der Wildtypprobe in der Probe aus RM361 zu kürzeren Wellenlängen verschoben. Das typische Häm d_1 Signal lag im Wildtypextrakt bei 638 nm, im Extrakt der $\Delta nirN$ Mutante jedoch bei 624 nm. Auch im Dithionit-reduzierten Zustand verhielten sich die Proben unterschiedlich. Das typische, reduzierte Häm d_1 Signal bei 623 nm trat im Spektrum des RM361 Extrakts nicht auf, statt dessen zeigte sich ein breites Absorptionssignal zwischen 580 und 670 nm. Auch die charakteristische Schulter des Wildtypspektrums bei 468 nm trat im Extrakt der Mutante nicht auf. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass in der $\Delta nirN$ Mutante eine andere Form der holo NirS gebildet wird. Diese NirS Variante musste jedoch katalytisch aktiv sein, denn der *P. aeruginosa* Stamm RM361 ließ sich trotzdem unter Sauerstoffausschluss mit Nitrat als Elektronenakzeptor kultivieren. Die *in vivo* Nitritreduktase-Aktivität von RM361 war dabei jedoch auf 57 % reduziert (Kawasaki *et al.*, 1997). NirN könnte daher für die Umsetzung eines Häm d_1 Vorläufers, 3,8-Dioxo-12,18-Didecarboxysirohäm (im Folgenden Dihydrohäm d_1 oder dd_1) verantwortlich sein. NirS könnte in Abwesenheit von NirN auch mit Dihydrohäm d_1 eine enzymatische Aktivität aufweisen. Um nun zu untersuchen, ob in RM361 tatsächlich nur Dihydrohäm d_1 gebildet wird, sollte in dieser Arbeit die Nitritreduktase NirS aus RM361 (NirS $_{\Delta N}$) isoliert werden und bezüglich ihres Kofaktorgehalts charakterisiert werden. Im ersten Schritt wurde zunächst untersucht, ob tatsächlich NirN für den geänderten Kofaktorgehalt der NirS $_{\Delta N}$ verantwortlich ist. Dafür wurde der Stamm RM361 mit plasmidkodierter NirN komplementiert.

3.1 Komplementation von *P. aeruginosa* RM361

Für die Komplementation der *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante RM361 durch plasmidcodiertes NirN wurde auf der Basis des Shuttle Vektors pUCP20T ein Plasmid erstellt, welches innerhalb der Multiple Cloning Site das native *nirN* Gen aus *P. aeruginosa* enthält. Für den korrekten Export des Proteins in das Periplasma wurde die native Leader Sequenz des *nirN* Gens beibehalten. Der Vektor pUCP20T enthält sowohl einen Replikationsursprung für *E. coli* als auch für *P. aeruginosa*. Während der Klonierung wurde *E. coli* DH10B als Wirt verwendet. Der *E. coli* Stamm ST18 wurde genutzt, um das Plasmid mittels Mating (Kapitel 2.3.9) in *P. aeruginosa* RM361 einzubringen. Die *P. aeruginosa* Stämme PAO1 (Wildtyp), RM361 und der mit pUCP20T*nirN* komplementierte Stamm RM361 wurden unter anaeroben Bedingungen mit einer Endkonzentration Nitrat als Elektronenakzeptor kultiviert. Die Kultivierung erfolgte im 250 mL Maßstab in LB-Medium, und die Anaerobenflasche wurde mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes inokuliert. Die Kultivierung erfolgte im Wasserbadschüttler bei 37 °C und 100 rpm für ca. 24 h. Die so erhaltene Bakterienkultur wurde sedimentiert und nach Kapitel 2.4.5 aufgeschlossen. Von dem so erhaltenen Periplasmaextrakt wurden dann UV-Vis Spektren aufgenommen (Abb. 3.1). Alle Spektren zeigten die typischen Charakteristika der im Periplasma enthaltenen c-Typ Cytochrome. Die Q-Banden der c-Typ Cytochrome bei 521 und 548 nm waren sichtbar, was darauf schließen lässt, dass nicht alle c-Typ Cytochrome im periplasmatischen Extrakt vollständig oxidiert vorlagen. Wie von Nicke *et al.* 2013 beschrieben, zeigte das Spektrum der Periplasmafraktion des Wildtypstammes ein typisches Häm d_1 Signal bei 637 nm, wogegen das Spektrum des Extrakts des Stammes RM361 ein breites Maximum um 618 nm aufwies. Das Spektrum des Extrakts des mit dem Vektor pUCP20T*nirN* komplementierten Stammes RM361 zeigte erneut die Charakteristika des Wildtypspektrums mit einem typischen Häm d_1 Signal um 637 nm. Der normale Kofaktorgehalt der NirS wurde offenbar durch plasmidcodiertes NirN in der Mutante RM361 wieder hergestellt. Die spektroskopischen Eigenschaften des *P. aeruginosa* RM361 Extrakts können daher tatsächlich auf das Fehlen des NirN Proteins zurückgeführt werden.

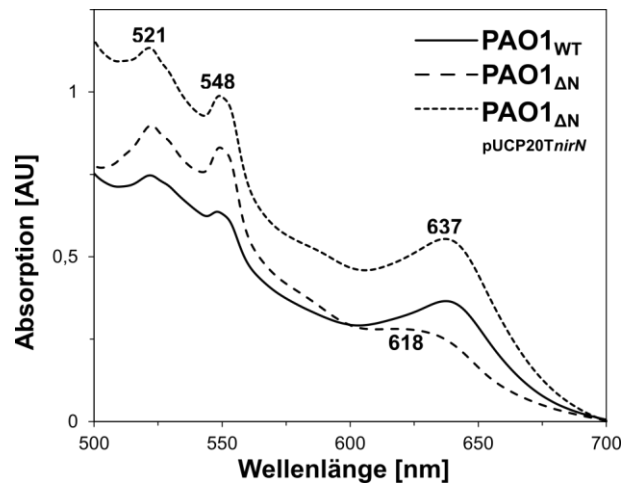


Abb. 3.1: *In vivo* Komplementation der *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante (RM361). Dargestellt sind die UV-Vis Spektren der periplasmatischen Extrakte von verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen. Der Extrakt des Wildtypstammes PAO1 (PAO1_{WT}) weist ein charakteristisches Häm d_1 Maximum bei 637 nm auf. In dem Extrakt der $\Delta nirN$ Mutante (PAO1 _{ΔN}) ist dieses Maximum zu kürzeren Wellenlängen verschoben und findet sich um 618 nm. Der Extrakt der mittels des Konstrukts pUCP20T $nirN$ komplementierten Mutante (PAO1 _{ΔN} pUCP20T $nirN$) zeigt das charakteristische Wildtyp Spektrum mit einem Häm d_1 Maximum bei 637 nm.

3.2 Kultivierung von *P. aeruginosa* zur Produktion der Nitritreduktase

Im nächsten Schritt sollte nun die Nitritreduktase NirS aus dem Stamm RM361 isoliert werden, um den gebundenen Kofaktor genauer charakterisieren zu können. Nicke *et al.* hatten 2013 versucht, die Nitritreduktase NirS aus der *P. aeruginosa* Mutante RM361 zu isolieren. Jedoch war es unter den gewählten Bedingungen nicht möglich, eine NirS mit gebundenem Häm d_1 oder Dihydrohäm d_1 Kofaktor zu erhalten, da der Kofaktor während der Reinigung verloren ging. Die NirS ließ sich nur in ihrer semi-apo Form, also nur mit gebundenem Häm c Kofaktor, reinigen. Es musste daher ein neues Protokoll für die Kultivierung von *P. aeruginosa* und die Reinigung von NirS entwickelt werden, welches die holo NirS aus *P. aeruginosa* RM361 mit gebundenem Kofaktor in ausreichender Menge für alle Folgeexperimente bereit stellte.

Um holo NirS in größeren Mengen zu produzieren, wurde zunächst ein definiertes Medium gewählt. Dabei handelt es sich um AB-Medium (modifiziert nach Heydorn *et al.*, 2000), welches mit verschiedenen Medienzusätzen ergänzt wurde. Um die Tetrapyrrolsynthese in *P. aeruginosa* zu fördern, wurde 5-Aminolävulinsäure (75 μ M Endkonzentration) eingesetzt. Da die Energiegewinnung durch Denitrifikation nur unter anaeroben Bedingungen induziert wird, wurde die Kultivierung im 1 L Maßstab in Anaerobenflaschen durchgeführt. Damit das Wachstum von *P. aeruginosa* unter diesen Bedingungen

stattfinden kann, wurde dem Medium Natriumnitrat als terminaler Elektronenakzeptor mit einer Endkonzentration von 75 mM zugefügt. Auf den Einsatz von Antibiotika wurde verzichtet, um das Wachstum von *P. aeruginosa* nicht unnötig zu verlangsamen. Das verwendete Medienrezept ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Medienkomponenten wurden nacheinander frisch am Tag der Kultivierung in die dampfsterilisierte Anaerobenflasche gefüllt und vorsichtig gemischt. Eine Übernachtskultur des entsprechenden *P. aeruginosa* Stammes wurde zum Inokulieren genutzt. Dabei wurde die Kultur 1:100 beimpft. Die Kulturen wurden mittels Butylsepten und Deckeln luftdicht verschlossen und für 24 h bei 37°C und 100 rpm kultiviert. Diese Kultivierungsbedingungen wurden für die Produktion von nativer NirS im *P. aeruginosa* Stamm RM361 und im Wildtyp Stamm verwendet. Die Bakterienkulturen von *P. aeruginosa* wuchsen unter diesen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte von 1,3 - 1,9. Die Kulturen wurden nach Ablassen des Gases geöffnet und für 25 min bei 3.900 x g und 4 °C sedimentiert. Die Bakterien wurden in Proteinpuffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) aufgenommen und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.1 Minimalmedium für die Produktion der Nitritreduktase in *P. aeruginosa* (verändert nach Heydorn *et al.*, 2000).

Medienkomponente	StammLösung	Eingesetztes Volumen pro L Kultur [mL]
Doppel destilliertes H ₂ O	-	800 mL
A10 Puffersystem	(siehe 2.1.7)	100 mL
Spurenelementlösung	(siehe 2.1.7)	1 mL
Glucose	1 M	20 mL
Magnesiumchlorid	1 M	1 mL
Eisensulfat	14 mg/mL	0,5 mL
Calciumchlorid	1 M	0,1 mL
Magnesiumsulfat	1 M	1 mL
Aminolävulinsäure	75 mM	1 mL
Natriumnitrat	1 M	75 mL

3.3 Reinigung der nativen Nitritreduktase NirS aus *P. aeruginosa*

Für den Aufschluss der Zellen und die Reinigung der nativen Nitritreduktase aus *P. aeruginosa* wurde das von Nicke 2013 etablierte Protokoll für die Reinigung der rekombinanten Nitritreduktase aus *P. stutzeri* verändert.

Die in Proteinpuffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) resuspendierten Zellen wurden zunächst in zwei Passagen durch die French Press bei 19.200 p.s.i. aufgeschlossen. Der so erhaltene zellfreie Extrakt wurde für 60 min bei 40.000 x g zentrifugiert, um den Nitritreduktase-haltigen Überstand zu erhalten. Der Puffer des Extrakts wurde über Nacht durch Dialyse gegen Puffer A getauscht. Danach wurde der Extrakt erneut zentrifugiert, um eventuell vorhandene restliche, unlösliche Zellbestandteile vor dem Auftrag auf die Anionentauschersäule abzutrennen. Die benötigte Zeit für die Isolierung der Nitritreduktase aus dem Extrakt sollte verkürzt werden, um den möglichen Verlust des Häm *d*₁ Kofaktors, der bei vorherigen Reinigungsversuchen aufgetreten war, zu verhindern. Das zuvor von Nicke verwendete Säulenvolumen des Anionentauschers von 100 mL wurde daher auf 15 mL reduziert, was einen deutlich kürzeren Waschschrift bedeutete. Dadurch wurde die Gefahr, den Kofaktor aus dem Protein auszuwaschen, erheblich reduziert. Außerdem wurde das Protein auf diese Weise wesentlich konzentrierter isoliert, sodass auch ein weiterer Schritt zum Konzentrieren des Proteins nach Beendigung der Chromatographie nicht nötig war. Die Anionen- und Kationentauscherchromatographie wurden dann nach 2.4.7 bzw. 2.4.8 durchgeführt. Die für die NirS aus dem Wildtypstamm PAO1 (NirS_{WT}) durchgeführte Anionentauscherchromatographie ist in Abbildung 3.2 A dargestellt, die der NirS aus der Mutante RM361 (NirS_{ΔN}) in Abbildung 3.2 C. Während der Chromatographie wurde die Proteinabsorption bei 280 nm, die Absorption des Häm *c* Kofaktors bei 410 nm und die Absorption des Häm *d*₁ bzw. möglichen Dihydrohäm *d*₁ Kofaktors verfolgt. Dafür wurde bei der Reinigung NirS_{WT} die Absorption von 638 nm verfolgt, bei der Reinigung NirS_{ΔN} die Absorption bei 625 nm. Auf diese Art und Weise konnte die eluierende NirS_{WT} bzw. NirS_{ΔN} leicht identifiziert werden, da sie bei allen drei Wellenlängen (280, 410 und 638 bzw. 625 nm) absorbiert. In den Abbildungen 3.2 A und 3.2 C ist zu erkennen, dass die Elution der NirS im linearen Gradienten jeweils bei ca. 80 mM NaCl beginnt und in einem distinkten

Maximum erfolgt. Diejenigen Elutionsfraktionen, die eine Absorption bei allen drei genannten Wellenlängen zeigten, wurden auf ihren NirS-Gehalt hin mittels SDS-PAGE analysiert. Für die Reinigung der NirS_{ΔN} ist dieses SDS-PAGE Gel in Abbildung 3.2 E dargestellt. Auf das Gel wurde eine Probe des Gesamtexttrakts vor der Anionentauscherchromatographie aufgetragen, sowie die Proben der Elutionsfraktionen 12-17. Es ist deutlich zu erkennen, dass die NirS_{ΔN} mit ca. 66 kDa in den Fraktionen 13-15 vorlag. Es ist außerdem zu erkennen, dass weitere Proteine in diesen Fraktionen vorlagen, die in diesem Schritt der Reinigung noch nicht abgetrennt wurden, da sie sehr wahrscheinlich einen ähnlichen isoelektrischen Punkt wie die NirS aufweisen. Die Fraktionen 13-15 wurden für den nächsten Reinigungsschritt mittels Kationentauscher ausgewählt und vereinigt. Nach der Dialyse der Proteinlösung zum Austausch des Puffers gegen Puffer C wurde diese auf die Kationentauschersäule aufgetragen, um weitere Verunreinigungen abzutrennen. Die Kationentauscherchromatographien der NirS_{WT} und NirS_{ΔN} sind in Abbildung 3.2 B bzw. D dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die NirS Proteine im Stufengradienten bei 250 mM NaCl von der Säule eluierten. Auch in diesem Schritt der Reinigung wurde beobachtet, dass der Häm *d*₁ Kofaktor in der NirS_{ΔN} gebunden blieb, da die Absorption des Kofaktors bei 625 nm gemeinsam mit der Proteinabsorption bei 280 nm und der Häm *c* Absorption bei 410 nm auftrat. Erneut wurden die Elutionsfraktionen der Kationentauscherchromatographie mittels SDS-PAGE analysiert (Abb 3.2 E für NirS_{ΔN}). Es ist deutlich zu erkennen, dass die NirS_{ΔN} bei ca. 66 kDa in den Elutionsfraktionen 6-10 enthalten war. Weiterhin konnten die nach der Anionentauscherchromatographie noch enthaltenen Verunreinigungen durch diesen zweiten Reinigungsschritt abgetrennt werden. Die Elutionsfraktionen 6-10 wurden vereinigt, in 500 µL Portionen aliquotiert und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die nativen NirS Proteine konnten also für die Isolierung ihrer nicht-kovalent gebundenen Kofaktoren benutzt werden. Für weitere Experimente, wie beispielsweise die Resonanz-Raman-Spektroskopie, wurden die nativen NirS Proteine aus *P. aeruginosa*, sowie die mittels pET22b*nirS* in *E. coli* rekombinant produzierte semi-apo NirS einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Dafür wurde mit den Proteinen eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, um möglichst reines Protein zu erhalten (nicht gezeigt). Die vereinigten Elutionsfraktionen der Gelpermeationschromatographie wurden

erneut einer SDS-PAGE Analyse unterzogen, welche in Abbildung 3.2 F dargestellt ist. Alle drei NirS Proteine (NirS_{WT}, NirS_{ΔN} und NirS_{s.a.}) sind bei ca. 66 kDa zu erkennen und lagen fast vollständig rein vor. Während die semi apo NirS aufgrund ihres fehlenden Häm *d*₁ Kofaktors im Eppendorf Gefäß eine rote Farbe aufwies, zeigten die nativen NirS Proteine aus *P. aeruginosa* aufgrund des gebundenen Häm *d*₁ Kofaktors eine grün-bräunliche Farbe. Die Farbe der NirS_{ΔN} war dabei bräunlicher als die der Wildtyp NirS, was sehr wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Besetzung der Proteine mit Kofaktor zurückzuführen ist. Mittels der hier beschriebenen Reinigungsmethode wurden aus 5 L *P. aeruginosa* Kultur ca. 30 mg Protein gewonnen. Die Proteine lagen direkt nach der Reinigung mit einer Konzentration von 3-4 mg/mL vor. Die drei unterschiedlichen NirS Varianten, NirS_{WT}, NirS_{ΔN} und NirS_{s.a.} standen somit für weitere Experimente zur Verfügung.

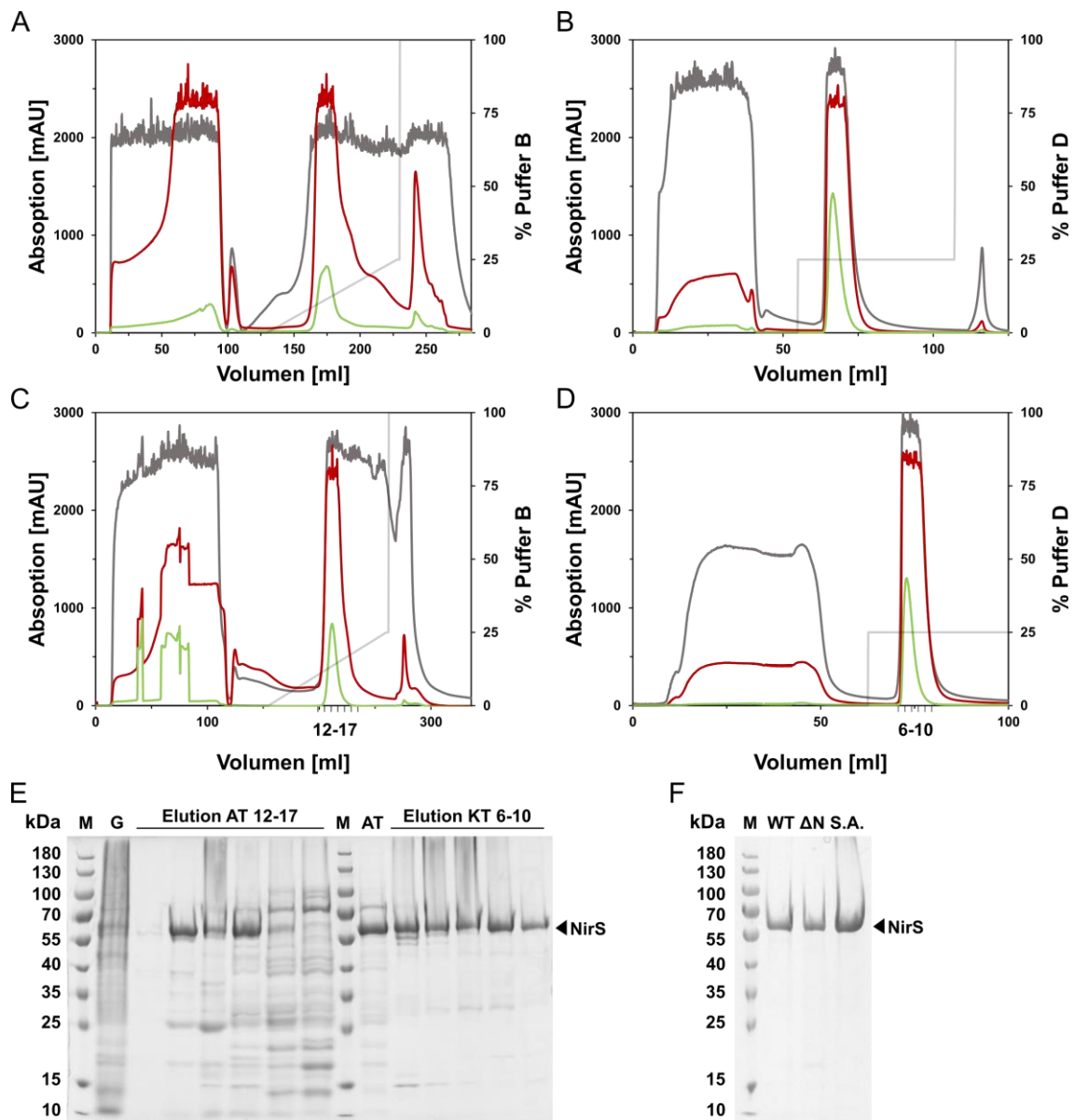


Abb. 3.2: Chromatographische Reinigungen der Nitritreduktasen aus *P. aeruginosa*. **A** Das Anionentauscherchromatogramm der Reinigung der Nitritreduktase aus dem *P. aeruginosa* Wildtyp (Nir_{SWT}). **B** Kationentauscherchromatogramm der Nir_{SWT}. **C** Anionentauscherchromatogramm der NirS aus *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ (Nir_{SΔN}). **D** Kationentauscherchromatogramm der Nir_{SΔN}. Es wurde jeweils die Absorption bei den Wellenlängen 280 nm (dunkelgrau), 410 nm (rot) und 638 nm (Nir_{SWT}) bzw. 625 nm (Nir_{SΔN}) in grün aufgezeichnet. In hellgrau dargestellt ist der prozentuale Anteil an Puffer B bzw. D. Die jeweiligen Elutionsfraktionen der Nir_{SΔN} sind markiert. **E** SDS-PAGE-Analyse der chromatographischen Reinigung der Nir_{SΔN}. **F** Die NirS Proteine wurden einer Gelfiltration unterzogen (nicht gezeigt) und erneut mittels SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen sind die NirS aus dem *P. aeruginosa* Wildtyp (WT), aus der *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante (ΔN) und eine in *E. coli* produzierte semi-apo NirS, welche kein Häm *d*₁, jedoch aber Häm *c* bindet (S.A.). **M** Größenstandard, die Molekularmassen sind markiert **G** Lösliche Proteine vor der Chromatographie **AT**=Anionentauscher bzw. vereinigte Elutionsfraktionen des Anionentauscherchromatographie **KT**=Kationentauscher.

3.4 Spektroskopische Analyse der Nitritreduktasen aus *P. aeruginosa*

Die gereinigten NirS Proteine wurden nun mittels UV-Vis Spektroskopie auf ihre Absorptionsmaxima hin untersucht. Die Spektren von NirS_{ΔN} und NirS_{WT} wurden aufgenommen und miteinander verglichen (Abb. 3.3). Es war deutlich zu erkennen, dass, wie bereits in den periplasmatischen Extrakten beobachtet, auch die spektralen Eigenschaften der gereinigten Proteine voneinander abwichen. Insbesondere die Häm *d*₁ Absorptionscharakteristika der NirS_{WT} wichen von denen der NirS_{ΔN} ab. Während die NirS_{WT} im oxidierten Zustand ein typisches Häm *d*₁ Absorptionsmaximum bei 642 nm aufwies, war dieses in der NirS_{ΔN} zu 626 nm verschoben. Auch im Dithionit-reduzierten Zustand ließ sich diese Beobachtung machen (Abb. 3.3 B). Das Häm *d*₁ Absorptionsmaximum war für die NirS_{ΔN} von 649 zu 631 nm verschoben. Diese Ergebnisse ließen weiter darauf schließen, dass es sich bei der NirS aus der Mutante RM361 um eine andere Form von holo NirS handelte. Betrachtet man die Struktur des möglichen Häm *d*₁ Vorläufers, Dihydrohäm *d*₁, so fällt auf, dass das konjugierte π -Elektronen-System des Moleküls weniger ausgedehnt ist als das des eigentlichen Häm *d*₁. Mit dieser Eigenschaft kann auch eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu kürzeren Wellenlängen verbunden sein (hypsochromer Effekt). Eben das ließ sich beim Vergleich der Spektren NirS_{WT} und NirS_{ΔN} beobachten. Es war daher möglich, dass es sich bei dem in der NirS_{ΔN} gebundenen Kofaktor tatsächlich um den Häm *d*₁ Vorläufer Dihydrohäm *d*₁ handeln könnte. NirN würde in diesem Fall eine Rolle in der Biosynthese von Häm *d*₁ einnehmen. Dabei würde es sich um die Katalyse des letzten Schritts der Häm *d*₁ Biosynthese handeln, der bislang NirF zugeschrieben worden war (Bali *et al.*, 2010). Desweiteren bestand auch die Möglichkeit, dass die spektralen Eigenschaften der NirS_{ΔN} darauf zurückzuführen waren, dass der Häm *d*₁ Kofaktor während der Maturation der NirS nicht korrekt in das Enzym inseriert wurde. In diesem Fall würde NirN eine Funktion während der Insertion des Häm *d*₁ Kofaktors in die NirS wahrnehmen. Um eine dieser beiden Möglichkeiten auszuschließen, sollte nun der in NirS_{ΔN} enthaltene Kofaktor genauer charakterisiert werden.

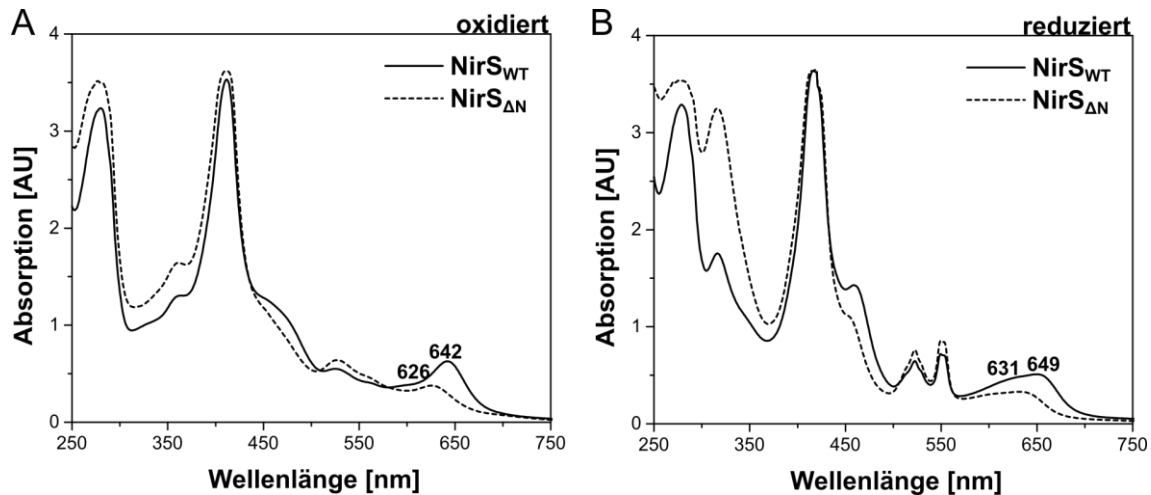


Abb. 3.3: UV-Vis Spektroskopie der gereinigten NirS Proteine. **A** Vergleich der Spektren der oxidierten NirS Proteine aus dem *P. aeruginosa* Wildtyp (NirS_{WT}) bzw. aus der $\Delta nirN$ Mutante (NirS_{ΔN}). Das Wildtypprotein wies ein charakteristisches Häm *d*₁ Maximum bei 642 nm auf. Für NirS_{ΔN} war dieses Maximum zu 626 nm verschoben. **B** Spektren der Dithionit-reduzierten NirS Proteine. Auch im reduzierten Zustand zeigte sich eine Verschiebung des Häm *d*₁ Maximums zu kürzeren Wellenlängen für NirS_{ΔN}. Die Absorptionsmaxima der Häm *d*₁ Kofaktoren sind markiert.

3.5 Resonanz Raman Spektroskopie der NirS Proteine

Um den in der NirS_{ΔN} enthaltenen Kofaktor in seiner Protein-gebundenen Form genauer zu charakterisieren, wurde die Resonanz Raman Spektroskopie eingesetzt. Die Messungen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Hildebrandt an der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Es wurde neben der NirS_{ΔN} und NirS_{WT} auch die semi apo NirS vermessen, um den Einfluss des kovalent gebundenen Häm *c* Kofaktors subtrahieren zu können. Die Messung fand unter flüssigem Stickstoff statt, also bei 80 K, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Resonanz Raman Signale des NirS gebundenen Häm *d*₁ wurden durch die Anregung der Proben bei 442 nm erhalten. Die durch die Anregung bei 413 nm beobachteten Signale konnten dagegen hauptsächlich dem Häm *c* Kofaktor zugeschrieben werden. Die Spektren des Häm *d*₁ in NirS_{WT} (Abb. 3.4 A) bzw. des Kofaktors in NirS_{ΔN} (Abb. 3.4 B) wurden durch die Subtraktion der oxidierten und reduzierten Häm *c* Spektren erhalten (Abb. 3.4 C, D). Durch die Aufnahme der semi-apo NirS Spektren bei 442 nm Anregung wurde der restliche Einfluss des Häm *c* Kofaktors auf das Häm *d*₁ Spektrum ausgeschlossen. Das Resonanz Raman Spektrum des Häm *d*₁ Kofaktors der NirS_{ΔN} und somit des möglichen Häm *d*₁ Vorläufers (Abb. 3.4 B) wies eine schwächere Resonanzverstärkung auf als das Spektrum des Häm *d*₁ (Abb. 3.4 A). Dies ließ sich anhand der begrenzten Delokalisation der π -Elektronen im Dihydrohäm *d*₁ im Vergleich zu Häm *d*₁ erklären und kann sowohl

absolute als auch relative Raman-Intensitäten beeinflussen. Für jedes Häm d_1 Signal ließ sich ein entsprechendes Signal im Spektrum des Kofaktors aus der NirS $_{\Delta N}$ finden, allerdings mit einer Verschiebung von $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ Wellenzahlen und abweichenden, relativen Intensitäten. Anhand der Signale eines Porphyrins über 1300 cm^{-1} ist es normalerweise möglich, Aussagen über den Oxidations-, Spin- und Koordinationszustand des zentralen Eisens zu treffen, da solche Signale bereits in der Literatur beschrieben wurden (Parthasarathi *et al.*, 1987). Häm c weist eine hohe Symmetrie auf, die Signale dieses Kofaktors können daher interpretiert werden. Die Spektren der Häm d_1 Kofaktoren zeigen allerdings viele Raman-aktive Schwingungen, da die Moleküle asymmetrisch sind. Es konnten daher nicht für alle Signale der Häm d_1 Kofaktor Spektren Aussagen getroffen werden. Jedoch war es möglich, die Schwingungen bei 1687 und 1725 cm^{-1} zuzuordnen. Die Schwingung bei 1687 cm^{-1} kann den C=O Schwingungen von Ketogruppen zugeordnet werden. Die Schwingung bei 1725 cm^{-1} der Carboxylfunktion der Acrylatseitenkette des Häm d_1 (DeVito *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1982). Daraus ließ sich ableiten, dass die beiden Kofaktoren aus den NirS Proteinen eine sehr ähnliche, aber keine identische Struktur aufweisen. Aus den Ergebnissen der Resonanz-Raman Messungen ging hervor, dass ein Dihydrohäm d_1 in der NirS $_{\Delta N}$ denkbar war.

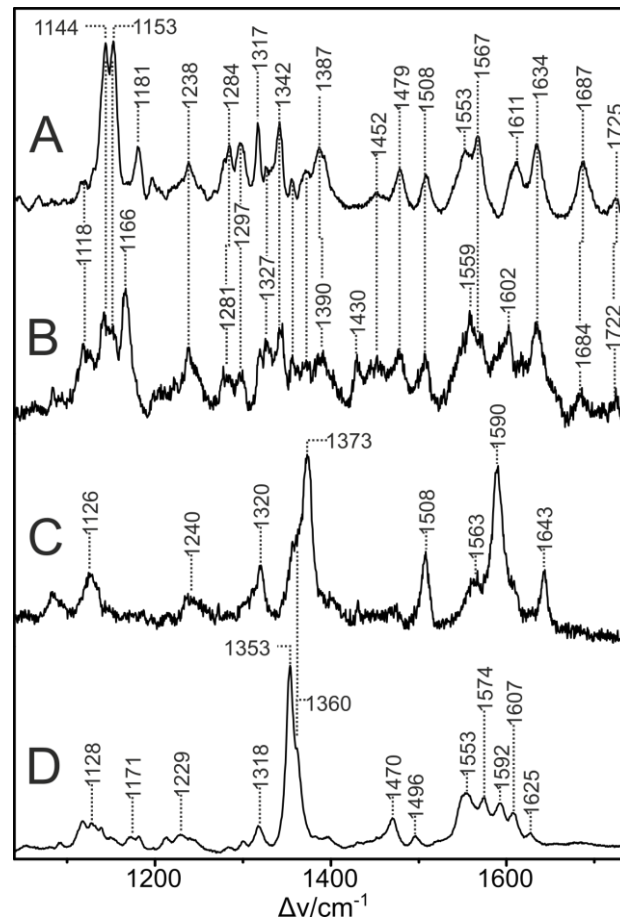


Abb. 3.4: Resonanz Raman Spektren von NirS Proteinen **A** Spektrum der NirS_{WT} **B** Spektrum der NirS_{ΔN} **C** Spektrum der oxidierten NirS_{s.a.} **D** Spektrum der Dithionit-reduzierten NirS_{s.a.} Die Spektren C und D wurden genutzt, um den Einfluss des Häm c Kofaktors subtrahieren zu können, wodurch die Spektren A und B erhalten wurden.

3.6 Charakterisierung der Nitritreduktase Kofaktoren

Neben der Charakterisierung des proteingebundenen Kofaktors der Nitritreduktase aus der *P. aeruginosa* $\Delta nirN$ Mutante sollte auch der Kofaktor extrahiert und in seiner freien Form untersucht werden. Dazu sollte zunächst eine Extraktionsmethode für den nicht-kovalent gebundenen Häm *d*₁ Kofaktor etabliert werden, sodass er in ausreichender Menge und Konzentration mittels UV-Vis Spektroskopie, HPLC und Massenspektrometrie untersucht werden konnte. Der Kofaktor aus der NirS_{WT} diene dabei jeweils als Vergleich.

3.6.1 Extraktion der Kofaktoren

Für die Extraktion des nicht-kovalent gebundenen Kofaktors der NirS Proteine sollte ein Protokoll etabliert werden, welches ermöglicht, den Kofaktor einfach, zügig und in ausreichender Menge vom Protein abzutrennen. Für die Extraktion von Häm *d*₁ aus der holo NirS existierten bereits in der Vergangenheit Protokolle (Walsh *et al.*, 1981). Diese beinhalteten jedoch eine Extraktion mittels HCl und

Aceton, welches im Verlauf der Extraktion zeitaufwändig eingeeengt werden musste. Dabei wurde eine schwach konzentrierte Lösung von Häm d_1 in Aceton erhalten. Alternativ wurde Häm d_1 aus Aceton mittels Zugabe einer kleinen Menge NaOH erhalten, da das Häm d_1 in die NaOH Phase übergeht (Walsh *et al.*, 1981). Mittels dieser Methode erhielt man eine konzentrierte Häm d_1 Lösung, deren pH-Wert jedoch auf etwa 7-8 eingestellt werden musste. In den in dieser Arbeit verwendeten Maßstäben stellte es sich jedoch als schwierig heraus, zuverlässig den gewünschten pH-Wert einzustellen. Es wurde daher eine neue Methode entwickelt, um die Kofaktoren aus den NirS Proteinen zu isolieren.

Horio *et al.* hatten 1961 die Freisetzung von Häm d_1 aus der Nitritreduktase durch Behandlung des Enzyms mit konzentrierter HCl beschrieben. Die Extraktion erfolgte daher nach dem in 2.4.15 beschriebenen Protokoll. Nach dem Auftauen wurden die NirS Proteine durch die Zugabe von HCl ausgefällt. Sofort erfolgte die Zugabe von einem Äquivalent Ethylacetat. Nach Mischen und anschließendem Sedimentieren des Ansatzes war die obere, kofaktorhaltige Phase im Falle der NirS_{WT} durch eine intensive, grüne Farbe gekennzeichnet und wurde vorsichtig abgenommen. Die kofaktorhaltige Phase der Extraktion des Kofaktors aus der NirS_{ΔN} wies im Vergleich eine schwächere, grau-grüne Färbung auf. Außerdem wurde beobachtet, dass das NirS Protein nach der Zentrifugation sedimentiert war. Das sedimentierte Protein zeigte eine rote Farbe, was für eine nahezu vollständige Extraktion des Häm d_1 Kofaktors spricht. Die organische Phase wurde nach der Extraktion in einem Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die so gewonnenen getrockneten Kofaktoren wurden direkt in Proteinpuffer aufgenommen und für Aktivitäts- und Bindungsassays eingesetzt.

3.6.2 UV/Vis Spektroskopie der extrahierten Nitritreduktase Kofaktoren

Die aus den NirS Proteinen nach Kapitel 3.7.1 isolierten Kofaktoren wurden nun auf ihre spektroskopischen Eigenschaften hin untersucht. Die getrockneten Kofaktoren wurden in Puffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) aufgenommen. Es wurden jeweils 150 μ L Ansätze erstellt und in einer Quartzküvette vermessen. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.5 dargestellt. Im oxidierten Zustand wies das Häm d_1 Spektrum Maxima bei 408 und 683 nm auf. Interessanterweise waren diese Maxima im Spektrum des aus der NirS_{ΔN} isolierten Kofaktors verschoben. Das Spektrum dieses Kofaktors wies

stattdessen Maxima bei 397 und 671 nm auf. Auch im Dithionit-reduzierten Zustand unterschieden sich die Spektren der beiden Kofaktoren. Die Maxima des Spektrums des Häm d_1 Kofaktors bei 457 und 627 nm waren im Spektrum des Kofaktors aus der NirS $_{\Delta N}$ zu 447 und 611 nm verschoben. Diese Ergebnisse unterstützten die Vermutung, dass es sich bei dem Kofaktor aus der NirS $_{\Delta N}$ tatsächlich um den Häm d_1 Vorläufer Dihydrohäm d_1 handelt.

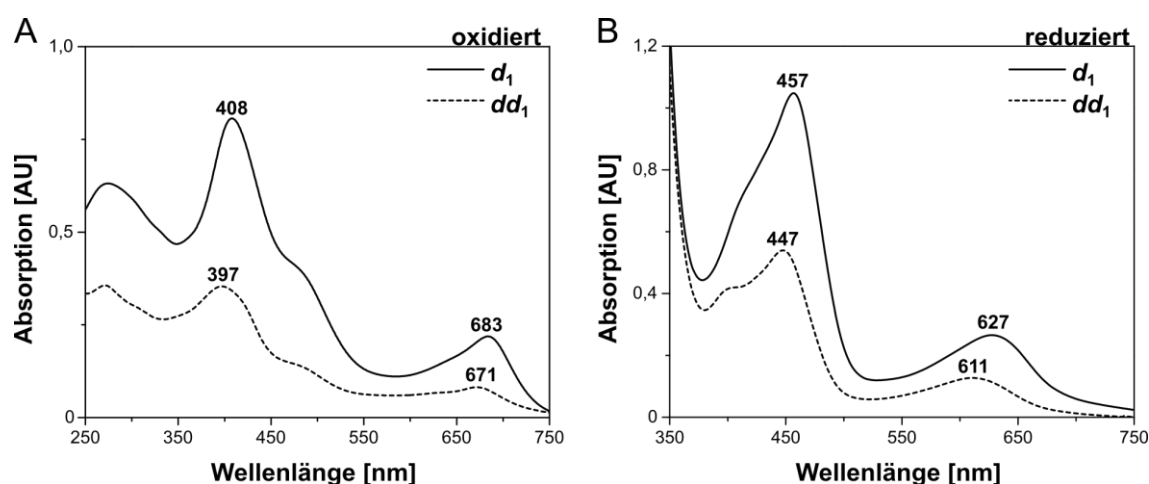


Abb. 3.5: UV-Vis spektroskopische Analyse der extrahierten Nitritreduktase Kofaktoren. **A** Spektren der Kofaktoren Häm d_1 (d_1) und dem möglichen Dihydrohäm d_1 (dd_1) im oxidierten Zustand. **B** Spektren der reduzierten Kofaktoren. Die Absorptionsmaxima sind markiert.

3.6.3 Identifikation der Kofaktoren durch massenspektrometrische Analyse

Um zweifelsfrei zu bestätigen, dass es sich bei dem Kofaktor aus der NirS $_{\Delta N}$ tatsächlich um Dihydrohäm d_1 handelt, wurden die extrahierten Kofaktoren mittels High Resolution ESI-MS analysiert. Diese Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Martin Hoffman (Institut für Anorganische und analytische Chemie) und Dr. Ulrich Papke (Institut für Organische Chemie) an der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Die Masse des $[M+H]^+$ Ions des Kofaktors aus der NirS $_{WT}$ stimmte mit 710,13 mit der theoretischen Masse von Häm d_1 überein. Interessanterweise besaß das $[M+H]^+$ Ion des Kofaktors aus dem NirS $_{\Delta N}$ mit 712,14 die Masse des Dihydrohäm d_1 . Auch das beobachtete Isotopenmuster stimmte mit der Summenformel von Dihydrohäm d_1 überein. Die entsprechenden experimentellen Massenspektren und Simulationen sind in Abb. 3.6 dargestellt. Der Massenunterschied zwischen den beiden Kofaktoren begründet sich in den zwei zusätzlichen Protonen der Propionatseitenkette des Dihydrohäm d_1 , welche im Verlauf des letzten Schrittes der Häm d_1 Biosynthese abgespalten werden. Dabei entsteht die charakteristische Acrylatseitenkette an Ring D des Häm d_1 . Die genauen Massen

der Kofaktoren, die durch die massenspektrometrische Analyse bestimmt wurden, zeigen, dass tatsächlich Dihydrohäm d_1 in *P. aeruginosa* RM361 gebildet wurde. Dies deutet auf eine mögliche enzymatische Aktivität des Proteins NirN im Rahmen des letzten Schritts der Häm d_1 Biosynthese hin.

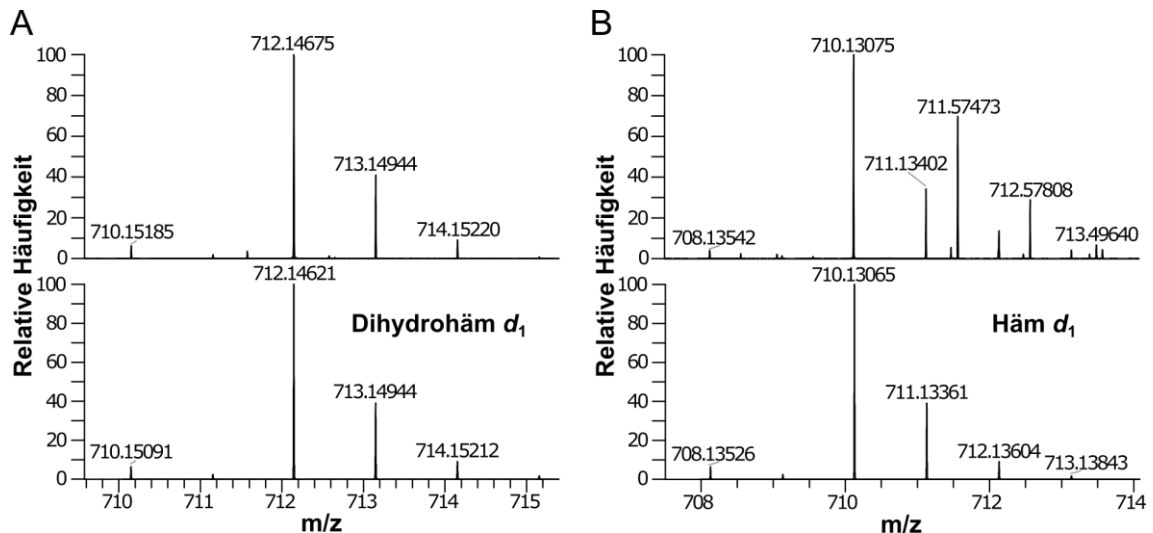


Abb. 3.6: Bestimmung der exakten Massen der Nitritreduktasekofaktoren mittels Massenspektrometrie. **A** Massenspektrum des Kofaktors aus der NirS Δ N (oben). Simulation des Massenspektrums des Dihydrohäm d_1 (unten). **B** Massenspektrum des Kofaktors aus dem NirSWT (oben). Simuliertes Massenspektrum für Häm d_1 (unten). Nicht charakterisierte Verunreinigungen sind bei 711.57, 712.57 und 713.49 in der Häm d_1 Probe (B) zu finden.

3.6.4 HPLC Analyse der Nitritreduktase Kofaktoren

Für die weitere Analyse der extrahierten Kofaktoren Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Melanie Kühner (Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig) eine geeignete HPLC Methode etabliert. Die Chromatographie wurde mittels einer Jasco 2000 Anlage (Groß Umstadt, Deutschland), die mit einer Equisil BDS C18-2 Säule der Firma Dr. Maisch (Ammerbruch-Entringen, Deutschland) ausgestattet war, durchgeführt. Während der HPLC Läufe wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 408 nm verfolgt. Auch die Fluoreszenz der eluierenden Substanzen wurde verfolgt (Anregung 409 nm, Emission 630 nm). Jedoch war aufgrund des zentralen Eisens der Kofaktoren kein Fluoreszenzsignal während der Läufe detektierbar. Die Durchführung der HPLC Läufe ist detailliert in Kapitel 2.6 beschrieben. Die Zusammensetzung der Lösungen und der Verlauf des Gradienten sind in Tabelle 2.10 dargestellt. Häm d_1 weist unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von 13.9 min auf, Dihydrohäm d_1 dagegen eine wesentlich längere Retentionszeit von 20.8 min (Abb. 3.7). Dihydrohäm d_1 scheint somit stärker mit

der Säule zu interagieren und hydrophober als Häm d_1 zu sein. Dihydrohäm d_1 muss nach seiner Synthese im Cytoplasma über die Cytoplasmamembran in das Periplasma gelangen. Möglicherweise fördern die Eigenschaften von Dihydrohäm d_1 die Passage des Moleküls über die Membran mittels eines bislang nicht identifizierten Transporters.

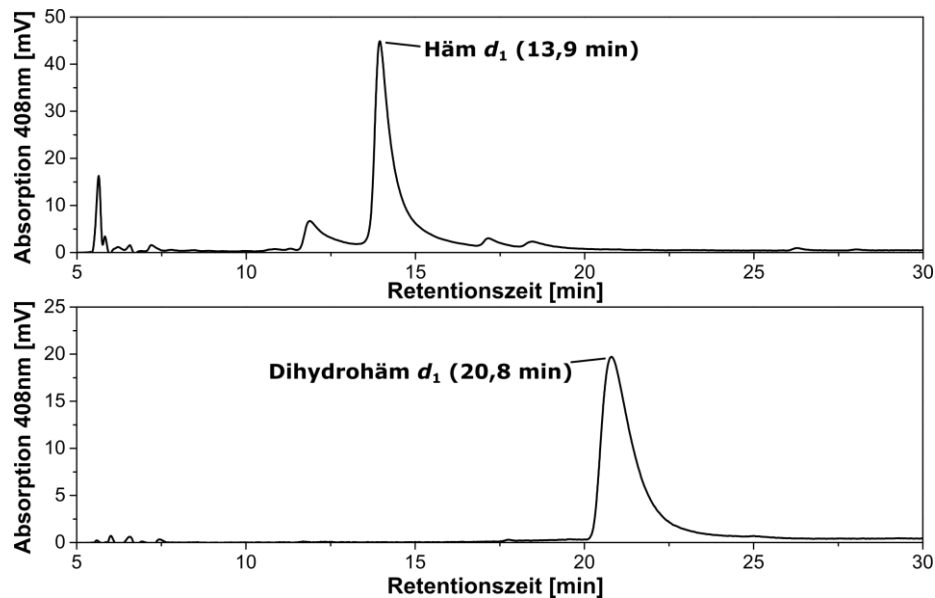


Abb. 3.7: HPLC Analyse der Kofaktoren Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 . Häm d_1 (oben) eluiert bei einer Retentionszeit von 13,9 min. Dihydrohäm d_1 eluiert bei einer Retentionszeit von 20,8 min. Die Absorption bei 408 nm ist gegen die Retentionszeit aufgetragen.

3.6.5 Bestimmung des Dihydrohäm d_1 Extinktionskoeffizienten

Die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten erfolgte über die Bestimmung der Konzentration des zentralen Eisens mittels ICP-MS. Der getrocknete Kofaktor wurde dafür in einem definierten Volumen Puffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst, und es wurde ein UV-Vis Spektrum aufgenommen. Die zweite Hälfte der Kofaktorprobe wurde durch die Firma Currenta (Leverkusen) auf ihren absoluten Eisengehalt hin überprüft (Kapitel 2.8). Da genau ein Eisenatom in jedem Kofaktormolekül enthalten ist, ließ sich aus der Eisenkonzentration und dem UV-Vis Spektrum der Extinktionskoeffizient ableiten. Für Dihydrohäm d_1 wurde so bei pH 7,5 ein Extinktionskoeffizient von $20,53 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei einer Wellenlänge von 670 nm ermittelt. Für Häm d_1 wurden bereits Extinktionskoeffizienten publiziert ($\epsilon_{682} = 8,5 \pm 0,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Walsh *et al.*, 1981), jedoch stimmten die Pufferbedingungen und pH-Werte dieser Experimente nicht mit dem hier verwendeten Puffer überein. Daher wurde die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten parallel auch für Häm d_1 erneut

durchgeführt. Bei einem pH-Wert von 7,5 in 50 mM Tris HCl und 150 mM NaCl wurde für Häm d_1 so ein Extinktionskoeffizient von $10,84 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei einer Wellenlänge von 683 nm bestimmt.

3.7 Bindung von Häm d_1 an NirN

Die Bindung des nach Kapitel 3.7.1 extrahierten Häm d_1 an NirN sollte überprüft werden. Dafür wurde NirN aus *P. aeruginosa* rekombinant, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, in *E. coli* produziert und gereinigt. Der Kofaktor Häm d_1 und NirN wurden, wie in Kapitel 2.4.16 beschrieben, vorsichtig gemischt. Dann wurden UV-Vis Spektren des Proteins aufgenommen (Abbildung 3.8 A). Das UV-Vis Spektrum von NirN ohne Häm d_1 wies aufgrund seines gebundenen Häm c Kofaktors lediglich die typischen Absorptionsmaxima bei 410, 520 und 548 nm auf. Im Vergleich dazu wies das Spektrum von NirN (34 μM) mit gebundenem Häm d_1 Kofaktor ein weiteres Absorptionsmaximum bei 625 nm auf. Dieses Maximum verschob sich im Spektrum des Dithionit-reduzierten Proteins zu 639 nm. In der Vergangenheit wurden bereits Kofaktor-Bindungsversuche mit NirN und Häm d_1 durchgeführt (Zajicek *et al.* 2009). Im Rahmen dieser Versuche wurde für NirN (*P. pantotrophus*) gebundenes Häm d_1 ein Absorptionsmaximum von 626 nm beobachtet. Dies stimmt sehr gut mit den in dieser Arbeit aufgenommenen UV-Vis Spektren überein. NirN aus *P. aeruginosa* ist daher in der Lage, Häm d_1 zu binden. Desweiteren lässt sich der gebundene Kofaktor im Protein reduzieren.

Mit NirN, das mit Häm d_1 inkubiert wurde, wurde außerdem eine Gelpermeationschromatographie (Kapitel 2.4.9) durchgeführt (Abbildung 3.8 B). Während der Chromatographie wurde die Absorption bei 280 nm (Proteinabsorption), 410 nm (Häm c Kofaktor) und 625 nm (Häm d_1 Kofaktor) aufgezeichnet. Es wurde beobachtet, dass Häm d_1 während der Chromatographie zusammen mit NirN co-eluiert. Die Absorption des Kofaktors bei 625 nm war während der Elution bei demselben Elutionsvolumen zu erkennen wie die Proteinabsorption bei 280 nm und die Häm c Absorption bei 410 nm. Häm d_1 bindet daher offenbar fest an NirN.

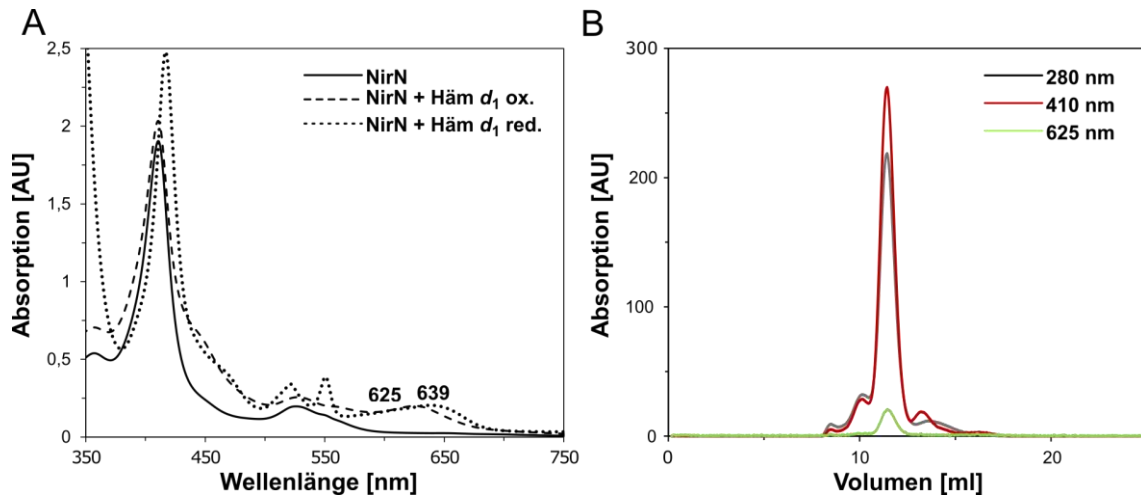


Abb. 3.8: Analyse der Bindung von Häm d_1 an NirN aus *P. aeruginosa*. **A** UV-Vis Spektroskopie von NirN (34 μ M), sowie von NirN mit gebundenem Häm d_1 in seiner oxidierten und Dithionit reduzierten Form. Absorptionsmaxima sind markiert. **B** Gelpermeationschromatographie von NirN mit Häm d_1 . Es wurde die Proteinabsorption bei 280 nm (grau), die Absorption des Häm c Kofaktors (410 nm in rot) und die Absorption des Häm d_1 bei 625 nm (grün) verfolgt.

3.8 NirN Aktivitätsassay mit Dihydrohäm d_1 als Substrat

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es sich bei dem zweiten Kofaktor der Nitritreduktase aus dem Stamm *P. aeruginosa* RM361 um Dihydrohäm d_1 handelt. Um zu testen ob das rekombinante NirN aus *P. aeruginosa* *in vitro* in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen, sollte ein Enzymaktivitätsassay etabliert werden. Dihydrohäm d_1 wurde in Proteinpuffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) zu einer Endkonzentration von 20 μ M gelöst und in einer Quarzküvette vorgelegt. Dann wurde die selbsttätige Aufnahme von Spektren durch das Photometer zwischen 575 und 725 nm gestartet. Dadurch wurde zunächst ein Spektrum des freien Dihydrohäm d_1 aufgenommen (Abb. 3.9 A). Danach erfolgte die Zugabe von NirN in die Küvette zu einer Endkonzentration von 20 μ M und einem Endvolumen von 150 μ L. Der Ansatz wurde durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt, und die Küvette wurde sofort wieder im Photometer platziert. So wurde in je ca. 15 s eine Messung der Probe durchgeführt. Direkt nach dem Mischen der Probe wurde das Auftreten eines Absorptionsmaximums bei 609 nm beobachtet. Bereits 15 s nach der Zugabe von NirN verschwand das Absorptionsmaximum bei 609 nm und ein neues Absorptionsmaximum bei 635 nm erschien. Das anfängliche Auftreten des Absorptionsmaximums bei 609 nm wurde als Bindung des Substrats Dihydrohäm d_1 an das Enzym interpretiert. Das Auftreten des Absorptionsmaximums bei 635 nm wies auf eine Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 hin. Jedoch würde

dies bedeuten, dass das Reaktionsprodukt im reduzierten Zustand gebildet wird (Abb. 3.8 A). Um dies genauer zu untersuchen, wurde der Reaktionsansatz nach vollendeter Bildung des Reaktionsprodukts mittels Natriumpersulfatpulver und vorsichtigem Mischen vollständig oxidiert. Das Spektrum des oxidierten Ansatzes wurde dann mit dem Spektrum von NirN mit gebundenem Häm d_1 im oxidierten und reduzierten Zustand verglichen (Abb. 3.9 B). Die Absorptionsmaxima des Persulfat-oxidierten Assayansatzes stimmten dabei mit denen des Spektrums von NirN mit gebundenem Häm d_1 im oxidierten Zustand überein. Das Absorptionsmaximum bei 635 nm, welches während der NirN Reaktion zu beobachten war, stimmte dagegen mit dem Spektrum von NirN mit reduziertem Häm d_1 überein. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass NirN tatsächlich in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 zu binden und zu Häm d_1 umzusetzen. Dabei wurde das Reaktionsprodukt Häm d_1 interessanterweise im reduzierten Zustand gebildet.

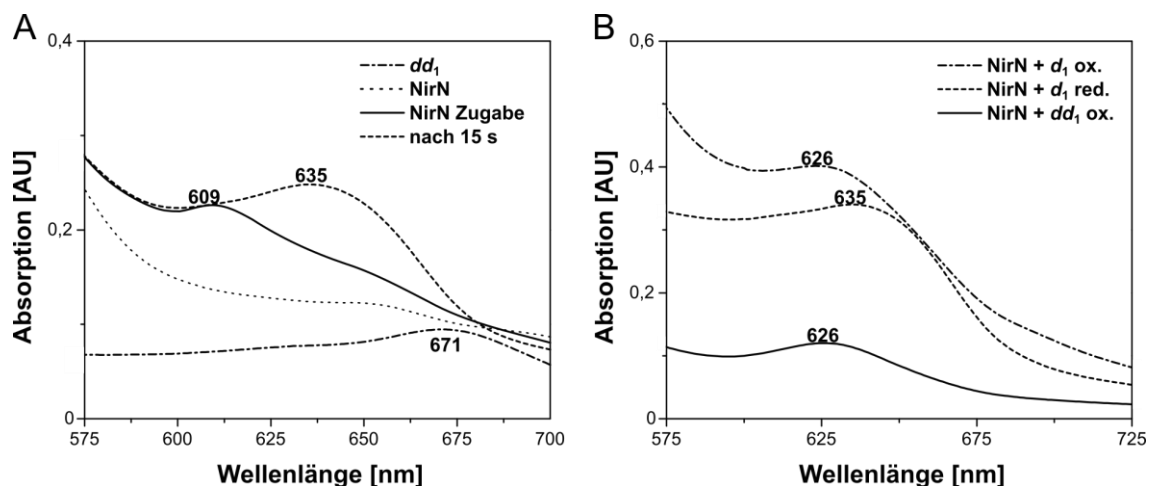


Abb. 3.9: NirN Enzymaktivitätsassay mit Dihydrohäm d_1 . A UV-Vis Spektroskopie von NirN inkubiert mit Dihydrohäm d_1 . Gezeigt sind die Spektren von Dihydrohäm d_1 gelöst in Proteinpuffer, NirN, sowie NirN inkubiert mit Dihydrohäm d_1 . Außerdem ist die UV-Vis spektroskopische Aufnahme des Reaktionsansatzes nach 15 s Inkubation dargestellt. B UV-Vis spektroskopische Analyse von NirN inkubiert mit Häm d_1 in oxidiert oder reduzierter Form als Vergleich zum Spektrum des NirN Aktivitätsassays mit Dihydrohäm d_1 als Substrat nach 15 s und Oxidation. Absorptionsmaxima sind markiert. d_1 = Häm d_1 , dd_1 = Dihydrohäm d_1

3.9 Analyse des NirN Reaktionsprodukts

Um abschließend nachzuweisen, dass es sich bei dem durch NirN gebildeten Reaktionsprodukt tatsächlich um Häm d_1 handelt, wurde das Reaktionsprodukt nach beendeter Reaktion aus NirN extrahiert (Kapitel 3.7.1) und mittels UV-Vis Spektroskopie untersucht. Dafür wurden auch Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 aus den Nitritreduktasen NirS_{ΔN} und NirS_{WT} extrahiert und deren Spektren mit dem

Spektrum des NirN Reaktionsprodukts verglichen (Abb. 3.10 A). Im Vergleich der Kofaktoren wurde beobachtet, dass das Spektrum des aus dem NirN Assay extrahierten Kofaktors die typischen Absorptionsmaxima des Häm d_1 Spektrums aufwies. Zusätzlich wurde das Reaktionsprodukt des NirN Assays auch mittels Massenspektrometrie untersucht (Abb. 3.10 B). Die gefundene Masse stimmte dabei tatsächlich mit der genauen Masse von Häm d_1 , 710.13, überein. NirN war somit in der Lage, den letzten Schritt der Häm d_1 Biosynthese, die Umsetzung des Vorläufers Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 zu vollziehen.

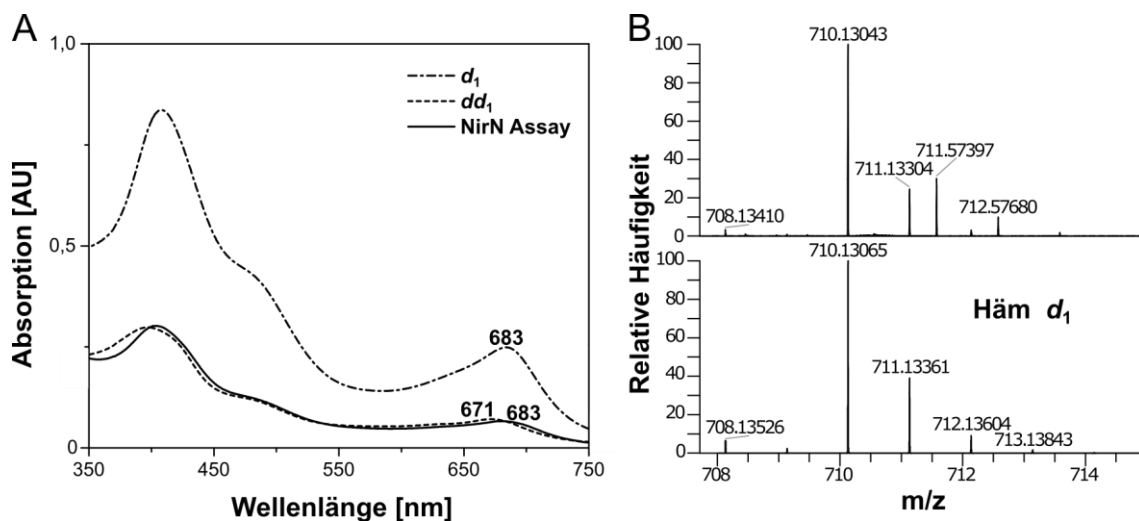


Abb. 3.10: Analyse des NirN Reaktionsprodukts. **A** UV-Vis Spektrum des extrahierten NirN Reaktionsprodukts im Vergleich zu den Spektren von Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 . Absorptionsmaxima sind markiert. **B** Massenspektrometrische Analyse des NirN Reaktionsprodukts. Das erhaltene Massenspektrum (oben) stimmt gut mit einem simulierten Häm d_1 Spektrum (unten) überein. d_1 = Häm d_1 , dd_1 = Dihydrohäm d_1

3.10 Transfer des NirN Reaktionsproduktes auf die semi apo NirS

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass das extrahierte Häm d_1 an eine Häm d_1 freie NirS bindet (Hill und Wharton, 1977; Weeg-Arsens *et al.*, 1991). Hier sollte sowohl Häm d_1 als auch Dihydrohäm d_1 an die Häm d_1 freie NirS aus *P. aeruginosa* gebunden werden. Extrahiertes Dihydrohäm d_1 bzw. Häm d_1 wurde in Proteinpuffer gelöst. NirS_{s.a.} wurde mit einer Endkonzentration von 20 μ M hinzugegeben. Die Ansätze wurden in eine Quarzküvette (Hellma, Deutschland) überführt und im Spektrophotometer vermessen. Das Spektrum der NirS_{s.a.}, welches zuvor keinerlei Absorptionsmaxima im Bereich um 600-700 nm aufwies, zeigte nun Absorptionsmaxima bei 627 bzw. 641 nm bei Bindung von Dihydrohäm d_1 bzw. Häm d_1 (Abb. 3.11 A). Die extrahierten Kofaktoren waren also in der Lage, an die semi apo NirS zu binden. Es sollte außerdem gezeigt

werden, dass das NirN Reaktionsprodukt Häm d_1 nach beendeter Reaktion durch NirN auf die Häm d_1 freie NirS übertragen werden kann. Dafür wurde die NirS_{s.a.} zu einer Endkonzentration von 20 μM zu einem NirN Assay Ansatz hinzugegeben, in dem Dihydrohäm d_1 vollständig zu Häm d_1 umgesetzt war. Die Übertragung des Reaktionsprodukts wurde mittels UV-Vis Spektroskopie verfolgt. Tatsächlich wurde beobachtet, dass das Gemisch nun ein Absorptionsmaximum bei 641 nm, entsprechend der NirS mit gebundenem Häm d_1 im oxidierten Zustand aufwies (Abb. 3.11A). Da das NirN Reaktionsprodukt im reduzierten Zustand gebildet wurde, ließ sich der oxidierte Zustand des an NirS gebundenen Reaktionsprodukts durch eine Oxidation an Luftsauerstoff während des aeroben Bindungsassays erklären. Das Spektrum von NirN mit Häm d_1 wies dagegen ein Absorptionsmaximum bei 626 nm im oxidierten bzw. 635 nm im reduzierten Zustand auf. Auch im reduzierten Zustand wies das Spektrum des mit NirS_{s.a.} versetzten NirN Assay Ansatzes die Absorptionsmaxima eines Spektrums der NirS mit gebundenem Häm d_1 im reduzierten Zustand auf (Abb. 3.11 B). NirN konnte das Reaktionsprodukt Häm d_1 also tatsächlich auf die NirS_{s.a.} übertragen.

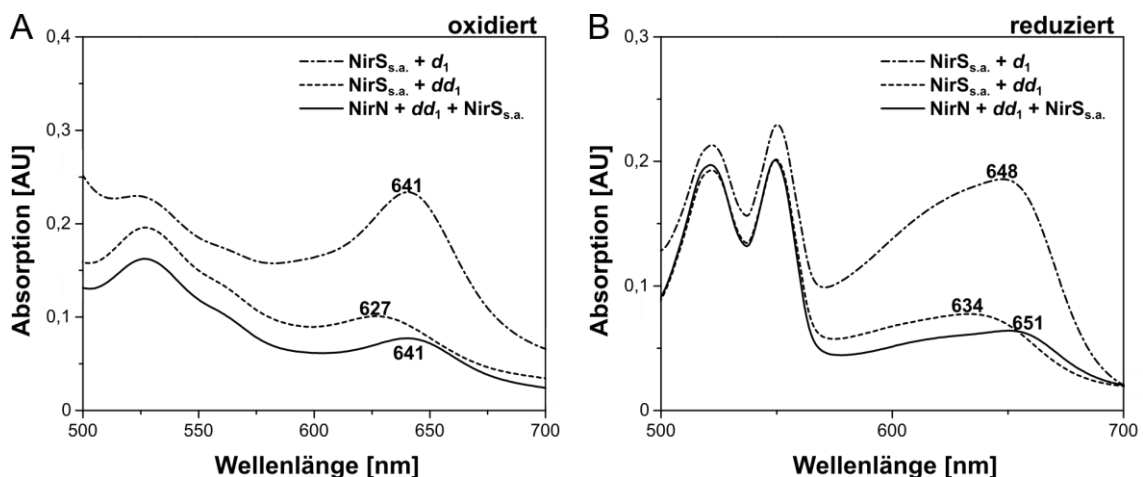


Abb. 3.11: Transfer des NirN Reaktionsprodukts auf die semi apo NirS. **A** UV-Vis Spektren der oxidierten semi apo NirS (NirS_{s.a.}) inkubiert mit Häm d_1 , Dihydrohäm d_1 bzw. NirN und dem Reaktionsprodukt Häm d_1 **B** UV-Vis Spektren der Dithionit reduzierten NirS mit Häm d_1 , Dihydrohäm d_1 bzw. NirN und dem Produkt der Reaktion. Absorptionsmaxima sind markiert. d_1 Häm d_1 dd_1 Dihydrohäm d_1

3.11 NirN Aktivitätsassay unter Sauerstoffausschluss

Die Umsetzung der Propionatseitenkette des Dihydrohäm d_1 zur Acrylatseitenkette des Häm d_1 erfordert das Abspalten von zwei Protonen und zwei Elektronen. Eines dieser Elektronen reduziert offenbar das Reaktionsprodukt Häm d_1 wie bereits in Kapitel 3.9 beschrieben. Auch das zweite

Elektron muss während der Reaktion abgeleitet werden. Da NirN keinen der typischen Dehydrogenase Kofaktoren, wie beispielsweise NAD^+ oder FAD, jedoch aber einen Häm c Kofaktor enthält, sollte überprüft werden, ob das zweite Elektron während der Reaktion auf den Häm c Kofaktor übertragen werden kann. Um die Reduktion des Häm c Kofaktors und somit die Übertragung des zweiten Elektrons auf den Häm c Kofaktor verfolgen zu können, wurde der NirN Enzymaktivitätsassay unter Sauerstoffausschluss im anaeroben Zelt wiederholt. Die Reoxidation des Häm c Kofaktors durch Sauerstoff wurde so verhindert. Der getrocknete Dihydrohäm d_1 Kofaktor wurde dabei im Anaerobenzelt direkt in anaerobisiertem Proteinpuffer gelöst. Das Protein NirN wurde für ca. 30 min im offenen Eppendorfgefäß im Anaerobenzelt stehen gelassen, um es zu anaerobisieren. Der Aktivitätsassay wurde direkt in der Quarzküvette durchgeführt, und es wurden alle 15 s Spektren im Bereich zwischen 450 und 700 nm aufgenommen. So wurde auch der Bereich der Häm c Absorptionsmaxima beobachtet. Zunächst wurde erneut das Spektrum des freien Dihydrohäm d_1 aufgenommen (Abb. 3.12). Anschließend wurde NirN zu einer Endkonzentration von 15 μM hinzugegeben und der Ansatz wurde vorsichtig gemischt. Erneut wurde das Auftreten eines Absorptionsmaximums bei 609 nm beobachtet. Während sich dieses Absorptionsmaximum im Laufe der Reaktion zu dem des reduzierten Reaktionsprodukts Häm d_1 bei 635 nm verschob, wurde auch das Auftreten von Absorptionsmaxima bei 522 und 550 nm beobachtet. Das Auftreten dieser Maxima ist typisch für die Q-Banden eines reduzierten Häm c Kofaktors. Das zweite bei der Reaktion frei werdende Elektron wird daher offenbar tatsächlich mittels der Reduktion des NirN gebundenen Häm c Kofaktors übertragen. Bei NirN handelt es sich daher um eine ungewöhnliche Dehydrogenase, die mittels eines Häm c Kofaktors anstelle eines Flavin Kofaktors oder $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ in der Lage ist, die zwei-Elektronen Oxidation von Dihydrohäm d_1 zu vollziehen. Ein solcher Reaktionsmechanismus ist aber denkbar, da das zweite Elektron das Produkt Häm d_1 reduziert.

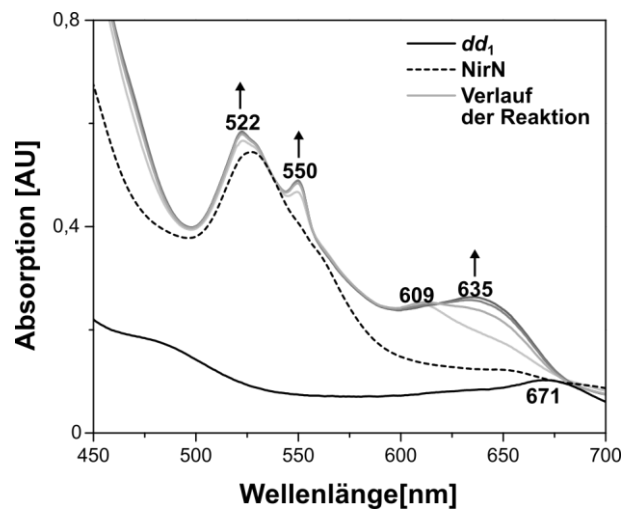


Abb. 3.12: NirN Enzymaktivitätsassay mit Dihydrohäm d_1 unter anaeroben Bedingungen. Das UV-Vis Spektrum des freien Substrats weist ein Absorptionsmaximum bei 671 nm auf, welches sich bei NirN Zugabe zu 609 nm verschiebt. Im Verlauf der Katalyse verschiebt sich dieses Maximum weiter zu 635 nm. Gleichzeitig erscheinen die Q-Banden des NirN gebundenen Häm c Kofaktors bei 522 und 550 nm. Dieser wird offenbar im Verlauf der Reaktion reduziert. dd_1 = Dihydrohäm d_1

3.12 Herstellung und Charakterisierung von NirN Varianten

Der katalytische Mechanismus von NirN sollte genauer untersucht werden. Dafür sollten Aminosäurereste bestimmt werden, die möglicherweise an der Oxidation der Propionatseitenkette von Dihydrohäm d_1 oder dem Elektronentransport beteiligt sein könnten. Diese Aminosäuren sollten dann ausgetauscht werden. Die entsprechenden NirN Varianten sollten auf ihre Fähigkeit überprüft werden, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen.

3.12.1 Modellierung von NirN mit Häm d_1

Es war bislang nicht möglich, die Kristallstruktur von NirN zu bestimmen. Um Aminosäurereste zu bestimmen, welche an der Bindung und Umsetzung von Dihydrohäm d_1 beteiligt sein könnten, wurde daher ein Modell von NirN mit Häm d_1 erstellt. Für die Vorhersage der Proteinstruktur wurde das Programm Phyre II verwendet (Kelley & Sternberg, 2011). Für die Berechnung des Proteinstrukturmodells wurde die Aminosäuresequenz des NirN Proteins aus *P. aeruginosa* ohne seine Leader-Sequenz für den periplasmatischen Export verwendet. Das Strukturmodell wurde mittels des Intensivmodus berechnet. Auch die Bindung von Häm d_1 innerhalb des Proteinmodells sollte modelliert werden. Dafür wurde das Programm Cofactor des Zhang Lab Servers verwendet (Yang *et al.*, 2013). Mittels dieses Programms kann die Interaktion von Proteinen mit potentiellen Liganden untersucht werden. Eine Gesamtansicht des

modellierten NirN Proteins mit beiden Kofaktoren ist in Abbildung 3.13 A (Seitenansicht) bzw. 3.13 B (Ansicht von unten) dargestellt. N-terminal befindet sich die Häm c bindende Domäne, welche den Häm c Kofaktor mittels des typischen -CXXCH- Motivs bindet. Diese Domäne wird über einen langen Linker mit der C-terminalen Domäne verbunden, bei der es sich um einen 8-blättrigen β -Propeller, bestehend aus acht Motiven von je 4-strängigen, antiparallelen β -Faltblättern, handelt. Die C-terminale Domäne bindet in ihrem Zentrum den Häm d_1 Kofaktor. Damit ähnelt dieses Modell von NirN stark der Struktur eines Monomers von NirS, welche ebenfalls durch eine N-terminale Häm c bindende Domäne und eine Häm d_1 bindende, C-terminale β -Propeller Domäne gekennzeichnet ist. Bei näherer Betrachtung konnten in der Häm d_1 bindenden Domäne in NirN Aminosäurereste bestimmt werden, welche für die Bindung des Kofaktors bzw. für die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 verantwortlich sein könnten. Die so ausgewählten Aminosäurereste sind in Abbildung 3.13 C dargestellt. Histidin 323 befindet sich in einer geeigneten Position, um das zentrale Eisen des Häm d_1 zu koordinieren. Auch Histidin 147 befindet sich in unmittelbarer Nähe des Häm d_1 Kofaktors und könnte für die Bindung des Tetrapyrrols verantwortlich sein. In der Nähe der Acrylatseitenkette, welche während des letzten Schritts der Häm d_1 Biosynthese aus der Propionatseitenkette des Dihydrohäm d_1 entsteht, befinden sich zwei interessante Aminosäurereste. Histidin 417 und Tyrosin 461 befinden sich 3,8 bzw. 3,2 Å von der Doppelbindung der Acrylatseitenkette entfernt (Abb. 3.13 D). Beide Reste kommen somit für die Deprotonierung während des letzten Schritts der Häm d_1 Biosynthese infrage. Alle so bestimmten Aminosäurereste sind in NirN Proteinen aus verschiedenen Organismen hoch konserviert (siehe Abb. 8.1) und wurden für den Aminosäureaustausch ausgewählt.

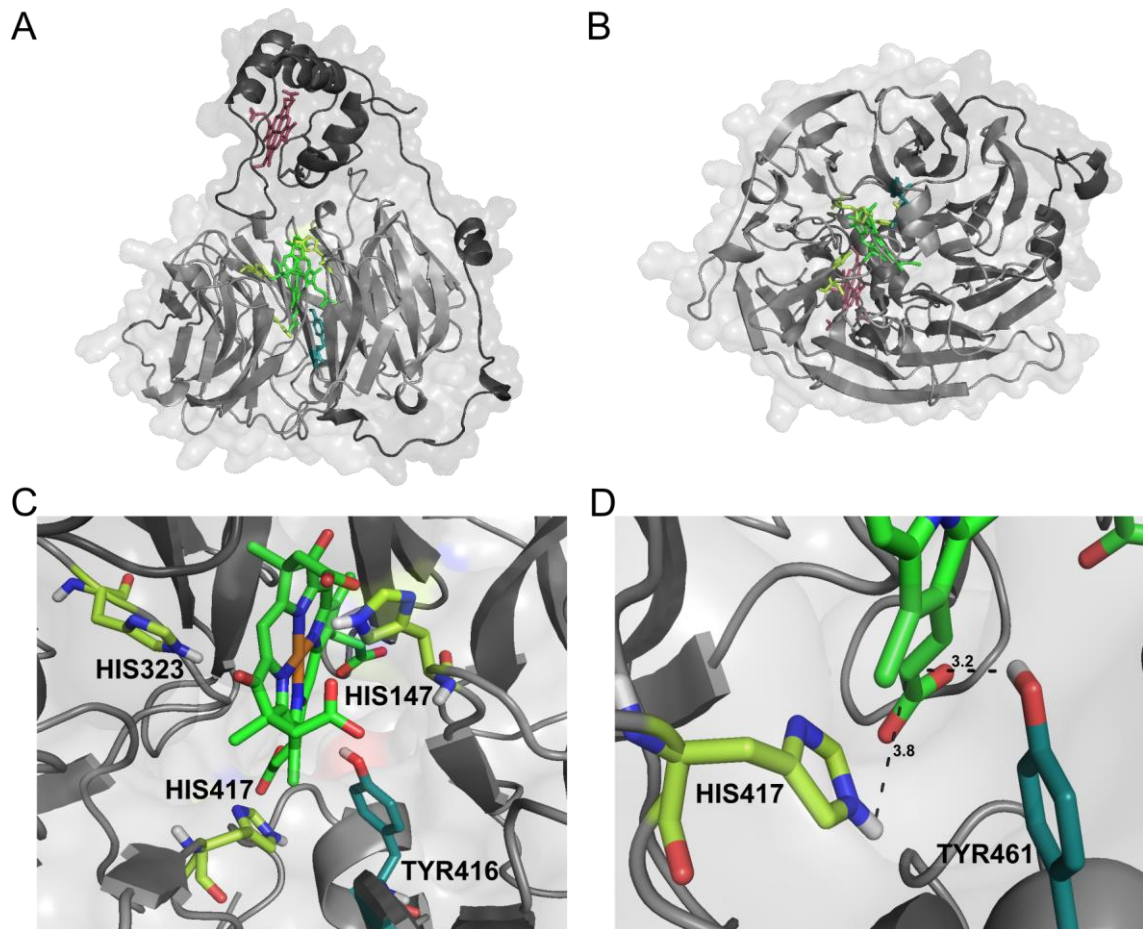


Abb. 3.13: NirN Strukturmodell mit Häm d_1 . **A** Seitliche Ansicht des NirN Strukturmodells. Das Strukturmodell wurde mittels Phyre2 erstellt. Die Häm d_1 und Häm c Kofaktoren wurden mittels Zhang Lab Cofactor modelliert. An die Häm c (rot) bindende N-terminale Domäne schließt sich ein langer Linker an (grau-schwarz). In hellgrau dargestellt ist die C-terminale β -Propeller Domäne, welche das Häm d_1 (grün) enthält. **B** Ansicht von unten, die β -Propeller Struktur und die Bindung des Häm d_1 in der C-terminalen Domäne ist zu erkennen. **C** Ein Teil der Aminosäurereste, welche potentiell an der Bindung und Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 beteiligt sein könnten, wurden markiert (Histidine = gelb, Tyrosin = türkis, O = rot, N = blau). His323 koordiniert möglicherweise das zentrale Häm d_1 Eisen (orange). Auch His147 könnte für die Bindung von Häm d_1 verantwortlich sein. **D** Die Acrylatseitenkette des Häm d_1 , welche durch die Umsetzung einer Propionatseitenkette in Dihydrohäm d_1 entsteht, ist dargestellt (grün). His417 und Tyr461 befinden sich in unmittelbarer Nähe des Substituenten und könnten an der Umsetzung beteiligt sein. Die Distanzen (in Å) des jeweiligen Aminosäurerestes von der Doppelbindung der Acrylatseitenkette sind markiert.

3.12.2 Mutagenese des *nirN* Gens mittels Infusion Kit

Die Mutagenese des *nirN* Gens wurde mittels des Infusion Kits (Clontech, Frankreich) nach 2.3.3 durchgeführt. Das Ziel der Mutagenese war der Austausch von Histidin 147, Histidin 323 und Histidin 417 jeweils gegen Alanin und Glutamin in den entsprechenden NirN Genprodukten. Tyrosin 461 sollte gegen Phenylalanin ausgetauscht werden, um möglichst wenig Einfluss auf die Proteinstruktur zu nehmen, jedoch eine mögliche katalytische Aktivität zu entfernen. Für die Mutagenese wurde der Vektor pET22bStreplI *nirN* verwendet, und die Wahl der Codons für den Austausch erfolgte Codon-optimiert für *E. coli*.

Die Mutagenese des *nirN* Gens mittels Infusion Kit war für alle sieben geplante NirN Varianten erfolgreich.

Auch die Rolle des Häm c Kofaktors während der Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 sollte genauer untersucht werden. Dafür wurde auch eine NirN Variante erzeugt, welche keine N-terminale Domäne, also auch keinen Häm c Kofaktor mehr besitzt. Die N-terminale Domäne wurde vor der Aminosäuresequenz -PQW- innerhalb der Linkersequenz von NirN deletiert. Der Strep II Tag für die Reinigung des Proteins, wurde an N-terminaler Position belassen. So wurde der Vektor pET22bStrepII*nirN*Cterm erstellt.

3.12.3 Produktion und Reinigung von NirN Varianten

Die Produktion und Reinigung der NirN Varianten fand, wie in Kapitel 2.4.1 bzw. 2.4.6 beschrieben, statt. Die Produktion und Reinigung der Varianten H323A, H417A, H417Q und Y461F war erfolgreich. Die anderen geplanten Varianten wurden durch den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) nicht produziert. Möglicherweise führte der Aminosäureaustausch in diesen Fällen zu strukturellen Veränderungen in NirN, die das Protein destabilisieren oder den Häm c Einbau beeinträchtigen. Die Reinigung der NirN Variante H417Q ist in Abbildung 3.14 A beispielhaft dargestellt. Die Anreicherung des Proteins NirN_{H417Q} in den Elutionsfraktionen der Strep-Tag Reinigung ist bei ca. 53 kDa deutlich zu erkennen, die Reinigung der anderen NirN Varianten verlief analog. Die NirN Varianten konnten in ausreichender Menge und Reinheit für UV-Vis spektroskopische Analysen gewonnen werden. Alle vier Proteinvarianten wurden mittels UV-Vis Spektroskopie auf das Vorhandensein des gebundenen Häm c Kofaktors überprüft (Abb. 3.14 B). Es war zu erkennen, dass die NirN Varianten den Häm c Kofaktor enthielten. Die entsprechenden Absorptionsmaxima des kovalent gebundenen Häm c Kofaktors waren deutlich bei ca. 410 nm bzw. um 526 nm zu erkennen. Die so gewonnenen NirN Varianten wurden für weitere Experimente verwendet.

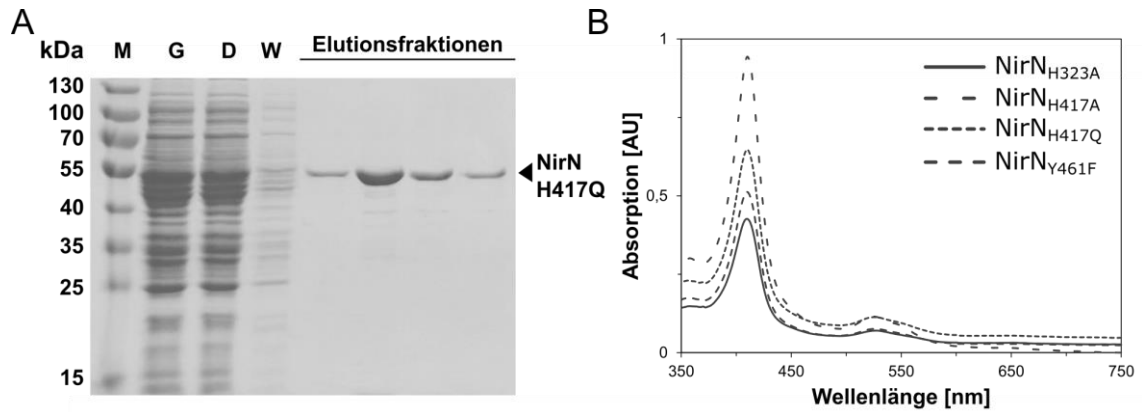


Abb. 3.14: Reinigung von NirN Varianten. **A** SDS-PAGE Analyse der Strep-Tag Reinigung der NirN Variante H417Q. Das Protein trägt einen N-terminalen Strep Tag und ist bei ca. 53 kDa zu erkennen. **B** UV-Vis Spektroskopie der gereinigten NirN Varianten (15 μ M). Die Spektren aller NirN Varianten zeigen typische Häm c Absorptionsmaxima bei 410 und 526 nm. **M** Größenstandard, die Molekularmassen sind markiert **G** Lösliche Proteine vor der Strep-Tag Reinigung **D** Durchfluss der Chromatographie **W** Waschfraktion der Reinigung

3.12.4 Enzymaktivität der NirN Varianten

Die produzierten und gereinigten NirN Varianten wurden auf ihre Enzymaktivität hin überprüft. Dabei wurde der in 3.9 beschriebene NirN Aktivitätsassay für jede der Varianten unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Ergebnis der Aktivitätsassays der NirN Varianten ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Die jeweilige NirN Variante wurde mit einer Endkonzentration von 15 μ M im Aktivitätsassay eingesetzt. Erneut wurde eine Lösung von Dihydrohäm d_1 (2 μ M) als Substrat in einer Quarzküvette vorgelegt, und die Reaktion wurde durch Zugabe von NirN gestartet. Es wurden Spektren zum Zeitpunkt $t=0$ und dann alle 15 s im Bereich zwischen 450 und 750 nm aufgenommen.

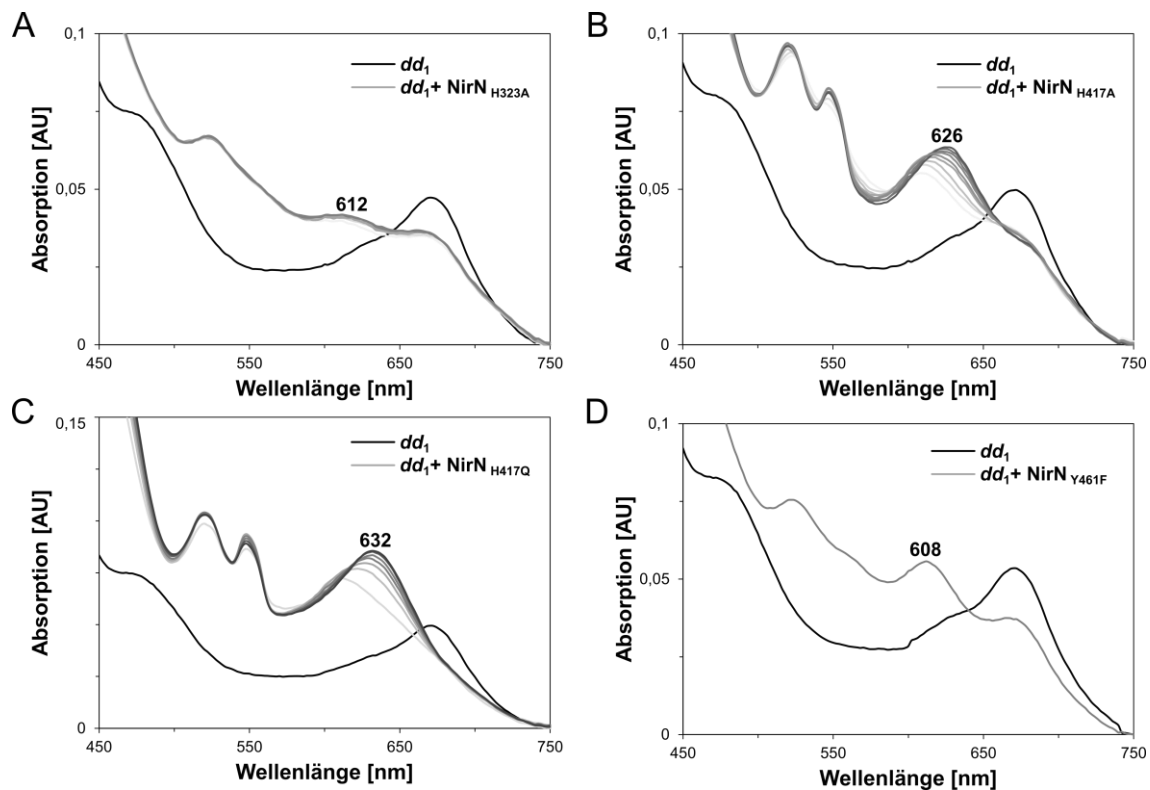


Abb. 3.15: Enzymaktivitätsassays der NirN Varianten. **A** UV-Vis Spektren des Assays mit NirN_{H323A}. Bei Zugabe von NirN_{H323A} tritt ein Absorptionsmaximum bei 612 nm auf, welches sich während der Inkubation nicht verschiebt. **B** UV-Vis Spektren des Assays mit NirN_{H417A}. Nach Zugabe des Proteins tritt ein Absorptionsmaximum bei 612 nm auf, welches es sich während der Inkubation zu 626 nm verschiebt. Zusätzlich erscheinen Absorptionsmaxima bei 520 und 548 nm. **C** UV-Vis Spektren des Assays mit NirN_{H417Q}. Bei Zugabe der Proteinvariante tritt ein Absorptionsmaximum bei 612 nm auf, welches sich während der Inkubation zu 632 nm verschiebt. Auch das Auftreten von Maxima bei 520 und 548 nm wird beobachtet. **D** UV-Vis Spektren des Assays mit NirN_{Y461F}. Nach Zugabe von NirN_{Y461F} tritt ein Absorptionsmaximum bei 608 nm auf, welches sich während der Inkubation nicht verändert. Der Zeitverlauf ist jeweils durch eine Veränderung des Grautons von hell zu dunkel dargestellt.

Bei Variante NirN_{H323A} ließ sich beobachten, dass direkt nach Zugabe des Proteins ein neues Absorptionsmaximum bei 612 nm auftrat (Abb. 3.15 A). Dieses Maximum verschob sich nicht wie beim Wildtypprotein während der andauernden Inkubation. Außerdem war trotz der relativ hohen Konzentration von Protein im Vergleich zum Substrat noch ein Maximum bei 671 nm zu beobachten, welches auf ungebundenes Substrat hinweist. Die Variante NirN_{H323A} schien daher tatsächlich Dihydrohäm d_1 nicht zu Häm d_1 umzusetzen. Außerdem war das Protein offenbar nicht in der Lage, das Substrat fest zu binden. Zusätzlich wurde der NirN gebundene Häm c Kofaktor im Verlauf der Inkubation nicht reduziert, da die typischen spektralen Eigenschaften des reduzierten Häm c nicht auftraten. Dies ließ darauf schließen, dass NirN_{H323H} Dihydrohäm d_1 nicht umsetzt. Das Histidin an Position 323 könnte somit für die Koordination des zentralen Eisens des Dihydrohäm d_1 Substrats verantwortlich

sein. Das Experiment sollte jedoch zusätzlich mit der Variante NirN_{H323Q} wiederholt werden, um einen möglichen Einfluss des Histidin-zu-Alanin Austausches auf die strukturelle Integrität von NirN auszuschließen.

Für die Untersuchung der Rolle des Histidin 417 wurde sowohl die Variante H417A als auch H417Q hergestellt. Der Aktivitätstest mit NirN_{H417A} zeigte eine Umsetzung des Substrats (Abb. 3.13 B). Nach der initialen Bindung des Substrats ließ sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von ca. 612 zu 626 nm beobachten. Interessanterweise entsprach dieses Maximum dem NirN gebundenen Reaktionsprodukt Häm d_1 im oxidierten Zustand oder dem freigesetzten Häm d_1 im reduzierten Zustand. Gleichzeitig ließ sich beobachten, dass die typischen Signale des reduzierten Häm c Kofaktors auftraten. Die Variante musste daher unverändert in der Lage gewesen sein, Elektronen aus der Reaktion über den Häm c Kofaktor aus der Reaktion abzuleiten. Auch bei dieser Variante ließ sich im UV-Vis Spektrum eine Schulter bei 671 nm erkennen, welche auf ungebundenes Substrat hinwies. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass NirN_{H417A} zwar in der Lage war, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen, allerdings dann das reduzierte Reaktionsprodukt sehr schnell entließ, was für eine verminderte Bindungsfähigkeit des Proteins bezüglich des Substrats und Produkts sprach. Die Variante NirN_{H417Q} zeigte im Aktivitätstest (Abb. 3.15 C) kaum Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp Protein. Nach der initialen Bindung des Substrats verschob sich das Absorptionsmaximum bei 612 zu 632 nm. Auch nach erneuter Messung dieses Assay Ansatzes nach einer bzw. zwei Stunden (nicht gezeigt), lag das Absorptionsmaximum des Reaktionsprodukts für diese Reaktion bei 632 nm, nicht bei 635 nm. Dies könnte einerseits durch eine veränderte Proteinumgebung durch den Austausch der Aminosäure Histidin gegen Glutamin verursacht worden sein; andererseits lag in in diesem Fall möglicherweise ein Gemisch aus NirN gebundenem Häm d_1 und freiem Häm d_1 jeweils im reduzierten Zustand vor. Aufgrund des Auftretens der Absorptionsmaxima bei 520 nm und 548 nm ließ sich außerdem schließen, dass der Häm c Kofaktor in dieser Variante ebenfalls reduziert wurde. Die Auswirkung des Austauschs des Histidin 417 gegen Alanin bzw. Glutamin deuteten auf eine Rolle dieses Aminosäurerests bei der Bindung von Dihydrohäm d_1 und des Reaktionsprodukts hin. Allerdings müssten noch mögliche Effekte der ausgetauschten Aminosäuren auf die strukturelle Integrität des Proteins

ausgeschlossen werden. Da beide H417 Varianten aber in der Lage waren, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen, ist H417 offensichtlich nicht direkt an der Bildung der Acrylatseitenkette beteiligt.

Die Variante NirN_{Y461F} ließ sich ebenfalls produzieren und reinigen. Während des Aktivitätsassays mit dieser Variante trat nach Zugabe des Proteins ein Absorptionsmaximum bei 608 nm auf (Abb. 3.13 D). Dieses Maximum verschob sich während der weiteren Inkubation nicht. Auch ließ sich keine Reduktion des Häm c Kofaktors der Variante beobachten, da die typischen Absorptionsmaxima des reduzierten Häm c nicht auftraten. Die Variante Y461F war offenbar nicht in der Lage, das Substrat umzusetzen. Außerdem ist ein weiteres Maximum bei 671 nm zu erkennen, was ein Hinweis auf ungebundenes Substrat auch bei dieser NirN Variante sein könnte. Aufgrund der räumlichen Nähe des zu Phenylalanin ausgetauschten Tyrosinrestes zu der Propionatseitenkette des Substrats und der Ergebnisse des Enzymtests lässt sich vermuten, dass Tyrosin 461 direkt an der Umsetzung des Substrats beteiligt ist. Da die strukturelle Ähnlichkeit von Tyrosin und Phenylalanin hoch ist, ist ein Einfluss des Austauschs auf die Proteinumgebung unwahrscheinlich.

Zusammenfassend lassen die oben beschriebenen Ergebnisse der Enzymtests folgende Vermutungen zu. Histidin 323 könnte für die Koordination des zentralen Eisens des Substrats verantwortlich sein. Tyrosin 461 ist möglicherweise der katalytisch essentielle Aminosäurerest bei der Umsetzung der Propionat zur Acrylatseitenkette. Histidin 417 dagegen ist trotz seiner räumlichen Nähe zur Propionatseitenkette des Substrats nicht für die Umsetzung verantwortlich, jedoch könnte es eine Rolle bei der Bindung des Substrats bzw. Produkts spielen.

3.12.5 Herstellung und Aktivitätsassay des NirN C-Terminus

Auch die C-terminale Domäne von NirN wurde, wie in Kapitel 2.4.1 bzw. 2.4.6 beschrieben, produziert und gereinigt. In den Elutionsfraktionen der Strep-Tag Affinitätschromatographie des NirN C-Terminus wurde im SDS-PAGE Gel ein Protein bei ca. 45 kDa sichtbar, welches der C-terminalen Domäne von NirN mit N-terminalem Strep II-Tag entspricht (Abb. 3.14 A). Das Protein wurde in ausreichender Menge für weitere Experimente erhalten (ca. 2 mg / L Kultur). Es wurde anschließend ein anaerober Aktivitätsassay mit dem NirN C-Terminus durchgeführt (Abb. 3.14 B). Das Substrat Dihydrohäm d_1 wurde mit einer

Endkonzentration von 5 μM vorgelegt, und das Protein wurde zu einer Endkonzentration von 15 μM hinzugegeben. Es wurde beobachtet, dass sich die Absorptionsmaxima des freien Substrats von 394 und 671 nm zu 434 bzw. 612 nm verschoben. Dies zeigte sehr wahrscheinlich die Bindung des Substrats an das Protein. Jedoch wurde während der Inkubation keine weitere Veränderung der Absorptionsmaxima des gebundenen Substrats beobachtet. Dies weist darauf hin, dass die C-terminale Domäne von NirN zwar in der Lage war, das Substrat vollständig zu binden, jedoch nicht umzusetzen. Offenbar war der in dieser NirN Variante fehlende Häm c Kofaktor für die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 nötig, um die Elektronen aus der Reaktion von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 zu übertragen.

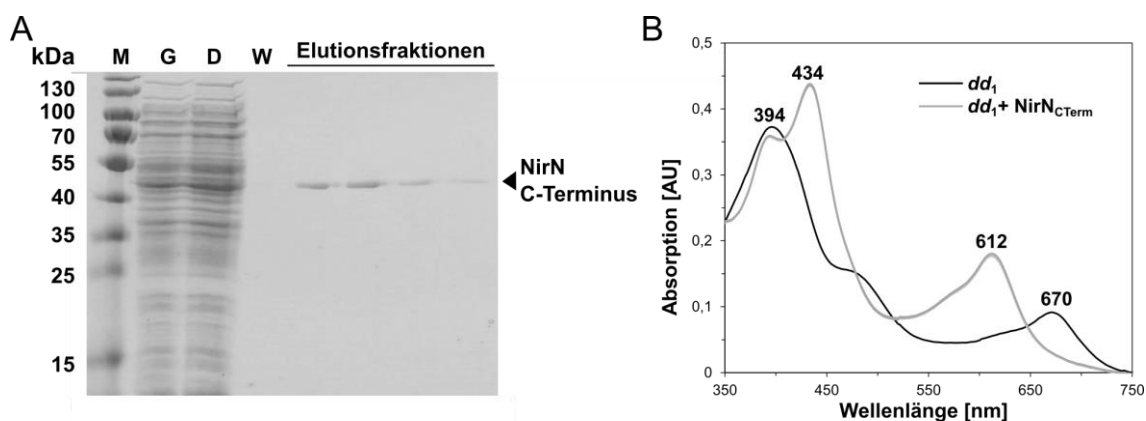


Abb. 3.14: Untersuchung des NirN C-Terminus. **A** SDS-PAGE Gel der Strep-Tag Affinitätschromatographie der NirN Variante ohne N-terminale Domäne und somit ohne Häm c Kofaktor. Das Protein mit N-terminalem Strep-Tag ist bei ca. 45 kDa zu erkennen. **B** UV-Vis Spektren des Enzymaktivitätsassays des NirN C-Terminus. Bei Zugabe der NirN Variante verschieben sich die Absorptionsmaxima des Substrats Dihydrohäm d_1 zu 434 bzw. 612 nm. **M** Größenstandard, die Molekularmassen sind markiert. **G** Lösliche Proteine vor der Strep-Tag Affinitätschromatographie, **D** Durchfluss der Chromatographie, **W** Waschfraktion der Reinigung dd_1 Dihydrohäm d_1 .

3.13 Ermittlung von Redoxpotentialen

Der intramolekulare Elektronentransfer in NirN sollte untersucht werden, um genauere Einsichten in den Reaktionsmechanismus von NirN zu gewinnen. Dafür sollte das Redoxpotential des NirN gebundenen Häm c Kofaktors ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) ermittelt werden. Außerdem sollten auch die freien bzw. NirN gebundenen Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 Kofaktoren ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) auf ihre Redoxpotentiale hin untersucht werden. Dafür wurde die zyklische Voltammetrie eingesetzt, welche freundlicherweise durch Dr. Luis Rosa in der Arbeitsgruppe von Dr. Falk Harnisch am Helmholtzzentrum für Umweltforschung (Leipzig, Deutschland) durchgeführt wurde. Die Versuche wurden in einem Rundkolben in

HEPES Puffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2) unter konstantem Stickstoff-Strom durchgeführt, um Sauerstoff auszuschließen. Sowohl NirN als auch freies Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 waren in der Lage, mit einer pyrolytischen Graphit Edge Plane Elektrode als Arbeitselektrode zu interagieren. Als Referenz diente eine Silberchloridelektrode (Ag/AgCl sat. KCl), als Gegenelektrode ein Platindraht. Bevor die Messungen stattfinden konnten, wurde NirN (je ca. 130 μ M) mit der Arbeitselektrode für 4 s inkubiert. Auch die freien Kofaktoren wurden direkt mit der Arbeitselektrode für 4 s inkubiert. Für die Messungen von NirN mit Häm d_1 oder Dihydrohäm d_1 wurde NirN mit dem jeweiligen Kofaktor äquimolar für 5 min inkubiert, bevor das Protein auf die Elektrode gegeben wurde. Die Messungen wurden mit einer Scanrate von 50 mV / s durchgeführt.

Die mithilfe zyklischer Voltammetrie ermittelten Redoxpotentiale sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die anhand der Basislinie korrigierten zyklischen Voltammogramme sind Abbildung 8.4 im Anhang dargestellt. Für NirN wurde ein Peak-Paar aufgezeichnet. Das daraus berechnete Standardredoxpotential des NirN gebundenen Häm c Kofaktors, bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode (SHE), betrug -88 ± 14 mV. Für freies Dihydrohäm d_1 wurde ein Redoxpotential von $+141 \pm 5$ mV gegen SHE bestimmt. Freies Häm d_1 wies ein Redoxpotential von $+175 \pm 5$ mV gegen SHE auf. Weiterhin wurde NirN jeweils mit Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 inkubiert und anschließend die Zyklovoltammetrie durchgeführt. Dabei zeigte NirN jeweils zwei Peak-Paare. Auffällig dabei war, dass die daraus bestimmten Redoxpotentiale des zweiten Peak-Paares für beide Messungen sehr nah bei einander lagen. Für NirN mit Dihydrohäm d_1 wurden Potentiale von -111 ± 10 mV (Häm c) und $+167 \pm 12$ mV (Dihydrohäm d_1) gegen SHE, für NirN mit Häm d_1 ein Potential von -101 ± 17 mV (Häm c) und $+169 \pm 18$ mV (Häm d_1) gegen SHE bestimmt. NirN war offenbar in der Lage, Dihydrohäm d_1 noch vor der Messung zu Häm d_1 umzusetzen. Daher waren die Potentiale des zweiten Peak-Paares nach der Inkubation von NirN mit Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 nahezu identisch. Bei den Messungen fiel auch auf, dass das Peak-Paar, welches für den kovalent gebundenen Häm c Kofaktor erhalten werden konnte, wesentlich schwächere Signale aufwies als die des Häm d_1 Kofaktors.

Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass NirN mit seiner C-terminalen, Häm d_1 bindenden Domäne zu der Elektrode hin orientiert vorliegt, die Häm c bindende Domäne somit von der Elektrode abgewandt ist. Das Redoxpotential des freien Häm d_1 lag sehr nahe bei dem des NirN gebundenen Häm d_1 ($+175 \pm 5$ mV bzw. $+169 \pm 18$ mV gegen SHE). Dagegen unterschieden sich die Redoxpotentiale der freien Kofaktoren Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 um ca. 34 mV. Berücksichtigt man die Standardabweichung der Redoxpotentiale des Häm c Kofaktors in den drei Ansätzen, so liegen auch diese Werte nahe bei einander.

Tab. 3.2: Durch zyklische Voltammetrie ermittelte Redoxpotentiale. Angegeben sind die Redoxpotentiale ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) von NirN, freiem Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 , sowie Protein gebundenem Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 bezogen auf die Wasserstoffelektrode (SHE).

	Häm c Potential gegen SHE [mV]	Häm d_1 Potential gegen SHE [mV]
NirN	-88 ± 14	-
Dihydrohäm d_1	-	$+141 \pm 5$
NirN + Dihydrohäm d_1	-111 ± 10	$+167 \pm 12$
Häm d_1	-	$+175 \pm 5$
NirN + Häm d_1	-101 ± 17	$+169 \pm 18$

Viele c-Typ Cytochrome weisen ein Häm c Redoxpotential von ca. +220 mV auf (Stryer, 2013). Deren zentrales Eisen ist durch Histidin und Methionin koordiniert. Das in dieser Arbeit ermittelte niedrige Redoxpotential von ca. -90 mV gegen SHE für NirN weist dagegen auf eine Bis-Histidin Koordination des zentralen Eisens hin (Pettigrew & Moore, 1987).

Neben dem Histidin des -CXXCH- Motivs, welches an der Bindung des Häm c Eisens beteiligt ist, befindet sich im Strukturmodell von NirN in der Nähe des Häm c Kofaktors ein Histidin Rest in entsprechender Position, der jedoch nicht konserviert ist. Ein Methioninrest befindet sich dagegen in gewisser Distanz auf einer flexiblen Schleife, dieser ist jedoch hoch konserviert in den NirN Proteinen aus verschiedenen Organismen (Anhang, Abb. 8.1). Für den Häm d_1 Kofaktor der Cytochrom cd_1 Nitritreduktase wurden bislang verschiedene Redoxpotentiale ermittelt. Für das Enzym aus *P. aeruginosa* wurde ein Potential von +287 mV gegen SHE bestimmt (Silvestrini *et al.*, 1994), für die Nitritreduktase aus *P. nautica* ein Redoxpotential von +199 mV gegen SHE (Besson *et al.*, 1995). Zajicek *et al.* bestimmten 2006 das Häm d_1 Redoxpotential einer Variante der Nitritreduktase aus *Paracoccus pantotrophus*, bei der das Eisen koordinierende

Methionin des Häm c Kofaktors gegen Histidin ausgetauscht wurde. Unter diesen Bedingungen wies der Häm d_1 Kofaktor ein Redoxpotential von +175 mV gegen SHE auf, was sehr gut mit dem in dieser Arbeit ermittelten Redoxpotential von Häm d_1 in NirN übereinstimmt. Interessanterweise war auch das Redoxpotential des Häm c Kofaktors der NirS aus *P. pantotrophus* durch die Bis-His Koordination verschoben und lag bei -60 mV gegen SHE. Dieser Wert liegt im Bereich des hier bestimmten Redoxpotentials des Häm c in NirN, was ein weiterer Hinweis auf eine Bis-Histidin Koordination des Häm c Kofaktors in NirN aus *P. aeruginosa* sein könnte. Die Koordination des zentralen Häm c Eisens in NirN muss jedoch in Zukunft mittels NirN Varianten genauer untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der NirN gebundene Häm c Kofaktor während der Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 reduziert wird. Außerdem findet in Abwesenheit der Häm c bindenden Domäne in NirN keine Umsetzung des Dihydrohäm d_1 statt. Elektronen müssen also vom Substrat Dihydrohäm d_1 zum Häm c Kofaktor gelangen. Dies setzt jedoch voraus, dass der NirN gebundene Häm c Kofaktor ein positiveres Redoxpotential als das Paar Propionat/Acrylat Seitenkette aufweist, welches bisher nicht bekannt ist. Laut der Ergebnisse der zyklischen Voltammetrie Experimente liegt das Redoxpotential des $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Paares im Substrat bzw. Produkt wesentlich höher als das des Häm c Kofaktors. Der Transfer eines Elektrons vom zentralen Eisen des Reaktionsprodukts auf den Häm c Kofaktor ist also thermodynamisch ungünstig. Dies bedeutet, dass höchstwahrscheinlich ein Elektron von der Propionatseitenkette direkt (ohne Umweg über das Eisen) auf das Häm c übertragen wird, während das zweite Elektron dann das zentrale Eisen des Reaktionsprodukts reduziert. Thermodynamisch möglich wäre solch ein Szenario, wenn entweder das Redoxpotential des Paares Propionat/Acrylat stark negativ ist (< -100 mV), oder eine Elektronenbifurkation vorliegt. Im zweiten Fall würde das Redoxpotential des Paares Propionat/Acrylat zwischen denen des Häm c und Häm d_1 liegen. Die Elektronenübertragung auf das Häm c wäre dann zwar thermodynamisch ungünstig, aber dennoch möglich durch die Kopplung an die exergone Reduktion des zentralen Eisens des Häm d_1 .

Um zu klären, ob in NirN tatsächlich eine Elektronenbifurkation abläuft, muss jedoch das Redoxpotential des Paares Propionat/Acrylat der Reaktion von

Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 ermittelt werden. Falls es sich bei NirN um eine elektronenbifurkierende Dehydrogenase handelt, wäre dies sehr ungewöhnlich, da NirN nur einen Häm c Kofaktor besitzt, nicht aber über einen zwei-Elektronen übertragenden Flavin Kofaktor oder über ein $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ verfügt (Voet *et al.*, 2016). Die bisher charakterisierten elektronenbifurkierenden Systeme nutzen in der Regel Flavin Kofaktoren (Peters *et al.*, 2016).

3.14 Kristallisation von NirN

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde versucht, NirN zu kristallisieren. Es war bislang jedoch nicht möglich, Kristalle von NirN zu erhalten. Die Kristallisation wurde nach 2.10 durchgeführt. Die verwendeten Kristallisationskits sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Das Protein wurde für die Kristallisationsversuche zusätzlich zur Strep-Tag Affinitätschromatographie mittels Gelpermeationschromatographie weiter gereinigt. Die Kristallisation wurde im sitting drop Verfahren durchgeführt. Es wurde versucht, das Protein sowohl ohne Substrat als auch mit Dihydrohäm d_1 als Substrat zu kristallisieren. Ein Teil der Kristallisationsversuche, sowie die Auswertung der Kristallisationsplatten fand freundlicherweise durch Dr. Jörn Krausze am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) statt. Kristalle von NirN ohne Substrat wurden in der Bedingung 79 des PGATM-Screens (Molecular Dimensions, UK) erhalten. Die Kristalle hatten die Form länglicher flacher Plättchen, die eine rötliche Farbe aufwiesen (Abb. 3.16). Bei den Kristallen handelte es sich tatsächlich um Protein. Es war jedoch nicht möglich von diesen Kristallen eine Kristallstruktur zu lösen, da sie lediglich bis 9 Å streuten.

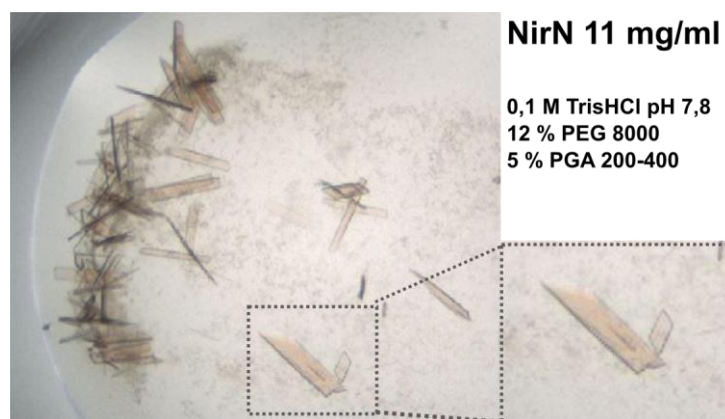


Abb. 3.16: NirN Kristalle ohne Substrat. Die Kristalle wurden in der Bedingung 79 des PGATM-Screens (Molecular Dimensions, UK) erhalten.

3.15 Betrachtung zum Katalysemechanismus von NirN

Das c-Typ Cytochrom NirN fungiert als eine ungewöhnliche Dehydrogenase, da es eine zwei-Elektronen Oxidationsreaktion mittels des ein-Elektronen-überträgers Häm c ermöglicht. Dies wird dadurch erreicht, dass das zweite Elektron aus der Oxidationsreaktion auf dem Reaktionsprodukt selbst verbleibt. Ein essentieller Aminosäurerest für die Katalyse scheint Tyrosin 461 zu sein. Dieses Tyrosin könnte sowohl als Base für die Protonenabstraktion von der Propionatseitenkette fungieren, als auch am Elektronentransport beteiligt sein. Diese Möglichkeiten müssen in Zukunft noch genauer untersucht werden.

Interessant ist auch weiterhin die Frage, welche Rolle der Rest Histidin 417 spielt. Möglicherweise ist His417 für den Transfer des zweiten Protons zuständig oder ist beteiligt an der Bindung des Substrats bzw. Produkts.

Auch die intramolekulare Übertragung des Elektrons, welches durch das NirN gebundene Häm c von der Reaktion abgeleitet wird, blieb bislang uncharakterisiert. Die Distanz zwischen der Acrylatseitenkette des Häm d_1 Reaktionsprodukts und dem Häm c Kofaktor stellt sich laut Strukturmodell mit ca. 24 Å als sehr weit für eine direkte Elektronenübertragung dar. Bei der Analyse des NirN Strukturmodells wurde eine Reihe von Phenylalaninresten beobachtet, die sich von der nahen Umgebung des Tyrosin Restes 461 bis zum kovalent gebundenen Häm c Kofaktor erstreckte (Anhang, Abb. 8.3). Mittels Mutagenese könnte die Signifikanz dieser Reste für die intramolekulare Elektronenübertragung in NirN überprüft werden.

Das bei der Reaktion auf das Häm c übertragene Elektron muss an einen Elektronenakzeptor weitergegeben werden, damit NirN weitere Zyklen katalysieren kann. Als Elektronenakzeptor kommt das im *nir*-Operon codierte NirC in Frage.

3.16 Produktion und Reinigung von NirF aus *Dinoroseobacter shibae*

Vor den hier beschriebenen Arbeiten war die Katalyse des letzten Schritts der Häm d_1 Biosynthese, die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 , NirF zugeschrieben worden. Da hier gezeigt wurde, dass NirN diese Funktion

übernimmt, stellt sich die Frage, welche Rolle NirF für die NirS Maturation im Periplasma spielt. Eine Möglichkeit wäre, dass NirF für die Aufnahme von Dihydrohäm d_1 in das Periplasma benötigt wird. Dazu sollte zunächst getestet werden, ob NirF in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 zu binden. Nicke *et al.* hatten 2013 ein Protokoll für die Produktion und Reinigung des NirF Proteins aus *Dinoroseobacter shibae* etabliert. In der Vergangenheit wurde auch versucht, rekombinantes NirF aus *P. aeruginosa* zu erhalten. Aufgrund der Anwesenheit eines Lipidankers war es jedoch nicht möglich, NirF aus *P. aeruginosa* löslich zu erhalten. Die Wahl fiel daher auch in dieser Arbeit auf NirF aus *D. shibae*. Das Protokoll für die Produktion von NirF aus *D. shibae* musste jedoch verfeinert werden, um eine größere Menge an Protein in reiner Form zu erhalten. Die rekombinante Produktion von NirF erfolgte mittels des Vektors pET22bnirF_{D.s.}PCSStrepII in *E. coli* BL21 (DE3). Produktion und Reinigung erfolgten dann nach Kapitel 2.4 mittels des StrepII-Tags des Proteins. Abbildung 3.17 A zeigt die SDS-PAGE Analyse der Strep-Tag Affinitätschromatographie von NirF (links), sowie die vereinigten Elutionsfraktionen der Gelpermeationschromatographie (GPC) von NirF (rechts). Die Gelpermeationschromatographie wurde durchgeführt, da nach der Affinitätschromatographie verunreinigende Proteine bei ca. 70 kDa auf dem Gel zu erkennen waren. In Abbildung 3.17 B ist das Chromatogramm der GPC von NirF abgebildet, wobei die Absorption des Proteins bei 280 nm verfolgt wurde. Es sind zwei Elutionspeaks während der Elution zu erkennen. Die Elutionsfraktionen beider Peaks wurden jeweils vereinigt und erneut mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.17 A). Dabei war zu erkennen, dass NirF mit ca. 45 kDa in beiden Peaks eluierte. Der erste Peak enthielt jedoch neben NirF auch eine große Menge einer Verunreinigung von ca. 70 kDa Größe. Um sowohl NirF als auch die Verunreinigung zweifelsfrei zu identifizieren, wurde eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt. Dies geschah freundlicherweise durch Beate Jaschok-Kentner am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) und nach Kapitel 2.4.14. Dabei wurde die 70 kDa große Verunreinigung als das Chaperon DnaK identifiziert. Bei dem Protein mit ca. 45 kDa handelte es sich tatsächlich um NirF. Es war daher möglich, mittels dieses Reinigungsprotokolls reines NirF aus *D. shibae* für Folgeexperimente zu erhalten. Das gereinigte NirF Protein wies keine Färbung auf, die auf einen

gebundenen Kofaktor, beispielsweise einen Flavinkofaktor, hätte schließen lassen.

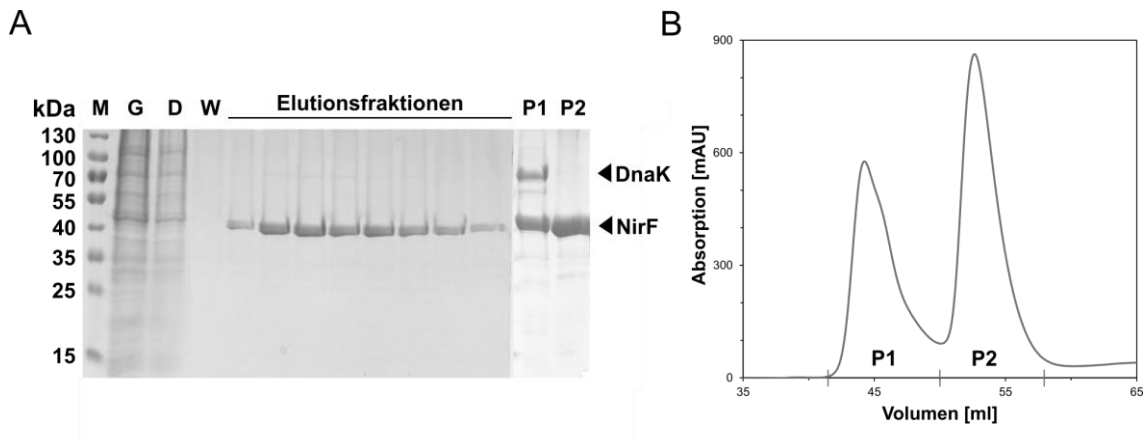


Abb. 3.17: Affinitätschromatographische Reinigung und anschließende Gelpermeationschromatographie von NirF. **A** SDS-PAGE Analyse der NirF Reinigung mittels des Strep-Tags (linker Teil). NirF ist bei ca. 45 kDa zu erkennen. SDS-Page Analyse der zwei Elutionspeaks der Gelpermeationschromatographie. **B** Chromatogramm der Gelpermeationschromatographie von NirF. Die Absorption bei 280 nm wurde aufgezeichnet. **M** Größenstandard, die Molekularmassen sind markiert **G** Lösliche Proteine vor der Strep-Tag Affinitätschromatographie **D** Durchfluss der Chromatographie **W** Waschfraktion der Reinigung **P1** Proteine des ersten Peaks der Gelpermeationschromatographie **P2** Proteine des zweiten Peaks der Gelpermeationschromatographie

3.17 Bindung von Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 an NirF

Um zu untersuchen, ob NirF an der Aufnahme von Dihydrohäm d_1 in das Periplasma und die Weitergabe an NirN beteiligt sein könnte, sollte überprüft werden, ob NirF aus *D. shibae* in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 zu binden. Als Kontrolle wurde auch Häm d_1 an NirF gebunden. Getrocknetes Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 (nach Kapitel 2.4.15) aus je 500 μ L 3 mg/ml NirS wurden direkt in Proteinpuffer (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) gelöst, der bereits NirF mit einer Konzentration von 38 μ M enthielt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und es wurden direkt UV-Vis Spektren in einer Quarzküvette aufgenommen. Wie in Abbildung 3.18 zu erkennen, verschoben sich die typischen Absorptionsmaxima des freien Häm d_1 bei Bindung an NirF zu 429 und 629 nm im oxidierten bzw. zu 448 und 627 nm im reduzierten Zustand. Auch die Absorptionsmaxima des freien Dihydrohäm d_1 verschoben sich bei Zugabe von NirF. NirF mit Dihydrohäm d_1 zeigte Absorptionsmaxima bei 421 und um 593 im oxidierten bzw. 438 und 608 nm im reduzierten Zustand. NirF ist offenbar auch in der Lage, Dihydrohäm d_1 zu binden und könnte an seinem Transport beteiligt sein. Außerdem konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass NirF nicht, wie bislang vermutet, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umsetzt. Das Spektrum von NirF

mit gebundenem Dihydrohäm d_1 veränderte sich bei andauernder Inkubation nicht weiter.

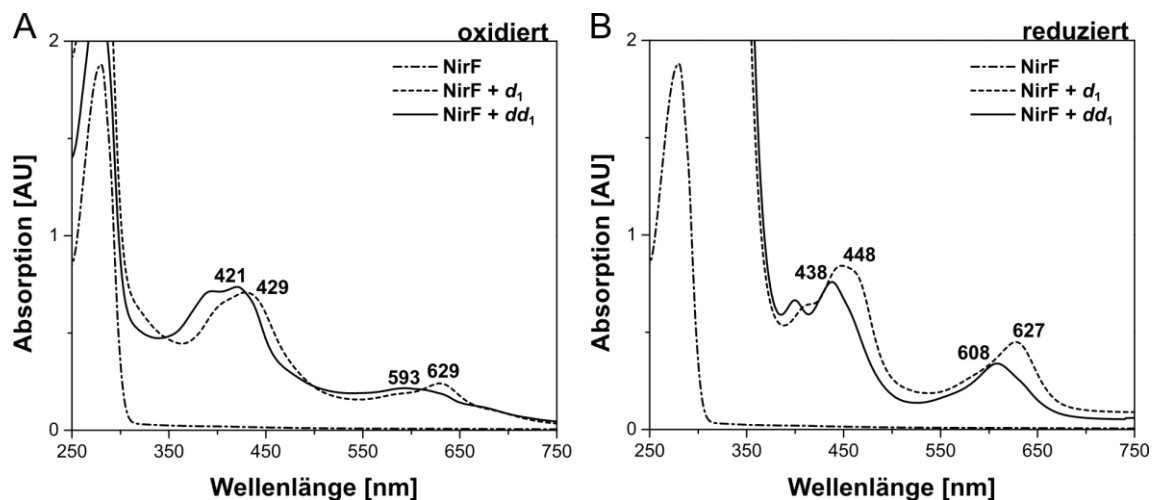


Abb. 3.18: Bindung von Dihydrohäm d_1 bzw. Häm d_1 an NirF. **A** UV-Vis Spektren von NirF, NirF mit gebundenem Dihydrohäm d_1 und gebundenem Häm d_1 im oxidierten Zustand. **B** UV-Vis Spektren von NirF mit gebundenen Kofaktoren im Dithionit-reduzierten Zustand.

3.18 Kristallisation von NirF

Für die Bestimmung der Kristallstruktur sollte NirF kristallisiert werden. Die Kristallisation geschah wie zuvor bei NirN nach Kapitel 2.10. Erneut wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Kristallisationskits verwendet. Die Kristallisationsversuche wurden gemeinsam mit Dr. Jörn Krausze am Helmholtzzentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt. In der Bedingung 34 des JCSG Core III Screens und der Bedingung 38 des JCSG Core IV Screens (Qiagen, Deutschland) wurden Proteinkristalle erhalten. Diese waren länglich und nadelförmig (Abb. 3.19). Aufgrund der Größe der Kristalle war es jedoch nicht möglich, einen Datensatz aufzunehmen. Die Kristallbedingungen wurden nach Kapitel 2.10 verfeinert, jedoch ohne größere Kristalle zu erhalten.

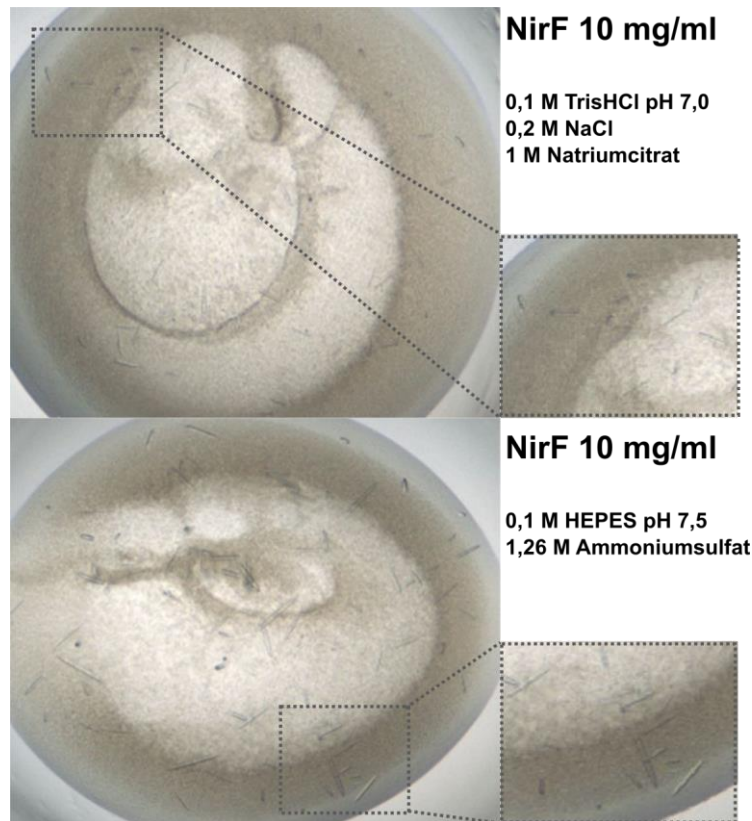


Abb. 3.19: NirF Kristalle. Kristalle von NirF wurden in der Bedingung 34 des JCSG Core III Kits (oben) und in der Bedingung 38 des JCSG Core IV Kits (unten) erhalten.

3.19 Modellierung von NirF mit Häm d_1

Da es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, die Kristallstruktur von NirF zu lösen, wurde ein Modell von NirF mittels Phyre 2 (Kelley & Sternberg, 2011) erstellt. Da NirF in der Lage ist, sowohl Häm d_1 als auch Dihydrohäm d_1 zu binden, wurde das Cofactor-Tool (Yang *et al.*, 2013) verwendet, um die Interaktion von NirF mit Häm d_1 zu modellieren. Das Strukturmodell von NirF ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass es sich bei NirF wahrscheinlich um ein Protein mit einer einzigen Domäne handelt, die in der Lage ist, Häm d_1 nahe des Zentrums des Proteins auf einer zentralen Achse zu binden. Das Protein zeigt dabei die Struktur eines acht-blättrigen β -Propellers, bestehend aus acht Motiven von je 4-strängigen, antiparallelen β -Faltblättern. Strukturell wäre NirF damit der C-terminalen Domäne von NirN sowie NirS sehr ähnlich. Bali *et al.* beschrieben 2010 einen hoch konservierten Histidinrest an Position 41 in NirF aus *P. pantotrophus*, welcher für die Koordination des Häm d_1 bzw. Dihydrohäm d_1 in Frage kommen könnte. Dieser Rest lässt sich im Strukturmodell von NirF aus *P. aeruginosa* tatsächlich an entsprechender Position wiederfinden (Histidin 42, Abb. 3.20 C). Der Rest ist in diesem Strukturmodell von Häm d_1

abgewandt, was aber nicht der tatsächlichen Orientierung in NirF entsprechen muss, da es sich nur um ein Modell handelt.

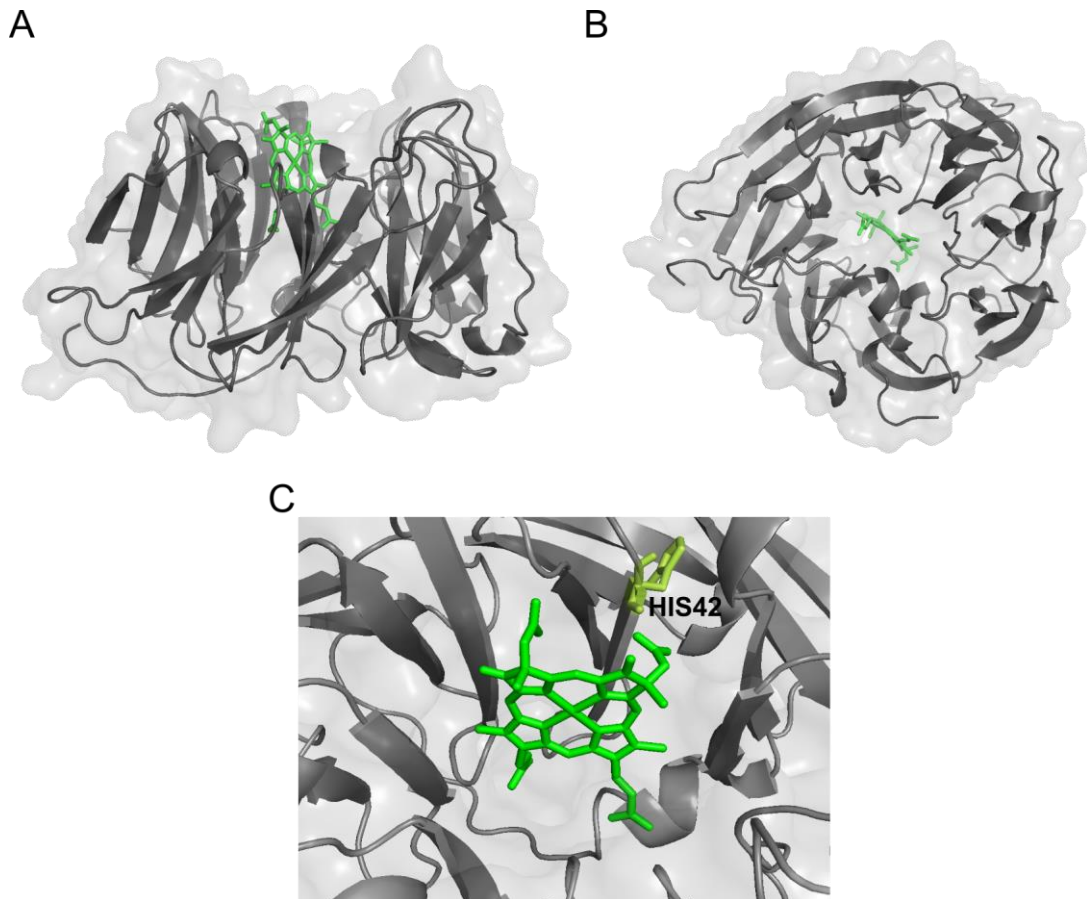


Abb. 3.20: Strukturmodell von NirF aus *D. shibae* mit Häm d_1 . **A** Seitliche Ansicht des NirF Modells mit Häm d_1 . **B** Ansicht des NirF Modells von unten. Anhand des Modells ist zu erkennen, dass es sich bei NirF um ein Protein mit einer einzigen Domäne handelt. Es zeigt die typische Struktur eines acht-blättrigen β -Propellers. Das modellierte Häm d_1 wird nahe der zentralen Achse des Proteins gebunden. **C** Detailansicht der Häm d_1 Koordination in NirF. Das konservierte Histidin 42, welches möglicherweise das zentrale Eisen von Häm d_1 bindet, ist gelb dargestellt.

3.20 Betrachtung zur Rolle von NirF

NirF war bislang hypothetisch die Umsetzung des Häm d_1 Vorläufers Dihydrohäm d_1 zugeschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass NirN diese Rolle in der Biosynthese von Häm d_1 übernimmt. Die Funktion von NirF für die Häm d_1 Biosynthese oder Insertion in NirS muss daher an anderer Stelle liegen.

Die bisherigen Untersuchungen zu NirF (Kawasaki *et al.*, 1997; Bali *et al.*, 2010; Nicke *et al.*, 2013) haben gezeigt, dass NirF benötigt wird, um eine intakte holo NirS zu bilden, dass NirF auf der periplasmatischen Seite an die

Cytoplasmamembran assoziiert vorliegt und dort mit NirN und NirS interagiert. Außerdem ist NirF in der Lage ist sowohl Dihydrohäm d_1 als auch Häm d_1 zu binden. Desweiteren könnte ein Histidinrest an der Koordination des Tetrapyrrols beteiligt sein. Diese bisherigen Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle von NirF für den Transport von Dihydrohäm d_1 über die Cytoplasmamembran und die Aufnahme des Intermediats in das Periplasma hin. Demnach würde NirF eventuell mit einem (noch unbekannten) Transporter interagieren und das Dihydrohäm d_1 von diesem übernehmen, um es an NirN weiterzugeben. Alternativ dazu könnte NirF auch als eine Art Gerüstprotein für die Interaktionen von NirN, NirS und möglicherweise auch weiterer Proteine der Denitrifikation fungieren.

Weiterhin ist die Möglichkeit, dass NirF eine enzymatische Aktivität während der Häm d_1 Biosynthese einnehmen könnte, nicht ausgeschlossen. Für NirJ konnte bislang keine vollständige Umsetzung von 12,18-Didecarboxysirohäm zu Dihydrohäm d_1 gezeigt werden (Linda Boss, persönliche Mitteilung). Eine Beteiligung an diesem Schritt der Häm d_1 Biosynthese ist für NirF daher möglich. In diesem Fall könnte ein Intermediat der Reaktion über die Cytoplasmamembran zu NirF gelangen, wo es weiter zu Dihydrohäm d_1 umgesetzt würde. Im Rahmen der Analyse des NirF Strukturmodells wurden keine zusätzlichen Kofaktor Bindestellen identifiziert. Jedoch ist es möglich, dass NirF einen der fünf bekannten *Quinon*kofaktoren enthält, der durch posttranslationale Modifikation entsteht (Lang und Klinman, 2013). Enzyme, die *Quinon*kofaktoren enthalten sind für die Oxidation von Aminen und Alkoholen zuständig. TPQ (2,4,5-Trihydroxyphenylalaninquinon) und LTQ (Lysin Tyrosylquinon) beispielsweise entstehen durch die Modifikation von Tyrosinresten eines Proteins innerhalb eines Aminosäuremotivs (–TXXNY(D/E)Y–) (Mure, 2004; Okeley & van der Donk, 2000). NirF besitzt laut der Analyse seiner Sequenz und seines Strukturmodells keines der Aminosäuremotive für die Bildung der posttranslationalen Modifikation oder eine Kupferbindestelle für die autokatalytische Modifikation des Proteins. Um jedoch zu überprüfen, ob NirF einen *Quinon*kofaktor enthält, sollte NirF in einem Organismus hergestellt werden, der in der Lage ist, diese posttranslationalen Modifikationen zu erzeugen. Anschließend sollte das Protein mittels Kristallisation auf einen *Quinon*kofaktor untersucht werden.

3.21 NirS Maturationsmodell in *P. aeruginosa*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Maturation der Nitritreduktase NirS in *P. aeruginosa* und insbesondere die Rolle von NirN während der Häm d_1 Biosynthese genauer aufgeklärt. NirN, dem bislang keine Rolle in der Biosynthese von Häm d_1 zugewiesen werden konnte, wurde als das Enzym identifiziert, welches den finalen Schritt der Häm d_1 Biosynthese katalysiert. Die an dieser Reaktion beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms wurden teilweise identifiziert. Es wurde außerdem gezeigt, dass NirF, welchem bislang die Katalyse des letzten Schritts der Häm d_1 Biosynthese zugeschrieben wurde, nicht daran beteiligt ist. Es ist allerdings in der Lage, Dihydrohäm d_1 und Häm d_1 zu binden. Anhand dieser Ergebnisse kann ein neues Modell für die Maturation der Nitritreduktase NirS in *P. aeruginosa* formuliert werden (Abb. 3.21).

Die Synthese der Nitritreduktase erfolgt im Cytoplasma. Der Export des Proteins in das Periplasma sowie die Abspaltung der Signalsequenz für den periplasmatischen Export erfolgt durch das Sec-Transportsystem. Der Häm c Kofaktor der NirS wird durch die membranständige Cytochrom c Maturationsmaschinerie eingebaut. Die Nitritreduktase kann daraufhin ihre finale Proteinfaltung einnehmen, jedoch ist die Reihenfolge des Einbaus der Kofaktoren nicht endgültig geklärt. Die Herstellung des Häm d_1 Vorläufers Dihydrohäm d_1 erfolgt im Cytoplasma durch CysG, NirE und NirDLGH und NirJ. Dihydrohäm d_1 muss über einen bislang unbekannten Transporter in das Periplasma gelangen. Ein mögliches Transportsystem könnte durch die Proteine NirO, P und Q gebildet werden. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine (NirO und P) bzw. eine ATPase (NirQ). NirF ist in der Lage, Dihydrohäm d_1 zu binden. Als membranassoziiertes Protein könnte NirF mit dem Dihydrohäm d_1 Transporter interagieren und Dihydrohäm d_1 entgegennehmen. Für NirF bleibt an dieser Stelle ungeklärt, ob es eventuell auch an der Herstellung von Dihydrohäm d_1 aus 12,18-Didecarboxysirohäm gemeinsam mit NirJ beteiligt ist. NirF, NirN und NirS interagieren miteinander (Nicke *et al.*, 2013). Während dieser Interaktion könnte Dihydrohäm d_1 von NirF auf NirN übertragen werden. NirN ist dann unmittelbar in der Lage, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen. Die *in vivo* Interaktion von NirS und NirN ist von NirF abhängig (Nicke *et al.*, 2013). Während

der Interaktion der drei Proteine überträgt NirN das Häm d_1 dann auf NirS. NirF scheint für diese Interaktion als eine Art Gerüstprotein zu fungieren, um die Interaktion zwischen NirN und NirS zu ermöglichen. Nach dem Einbau von Häm d_1 in NirS kann das Enzym Nitrit zu Stickstoffmonoxid reduzieren.

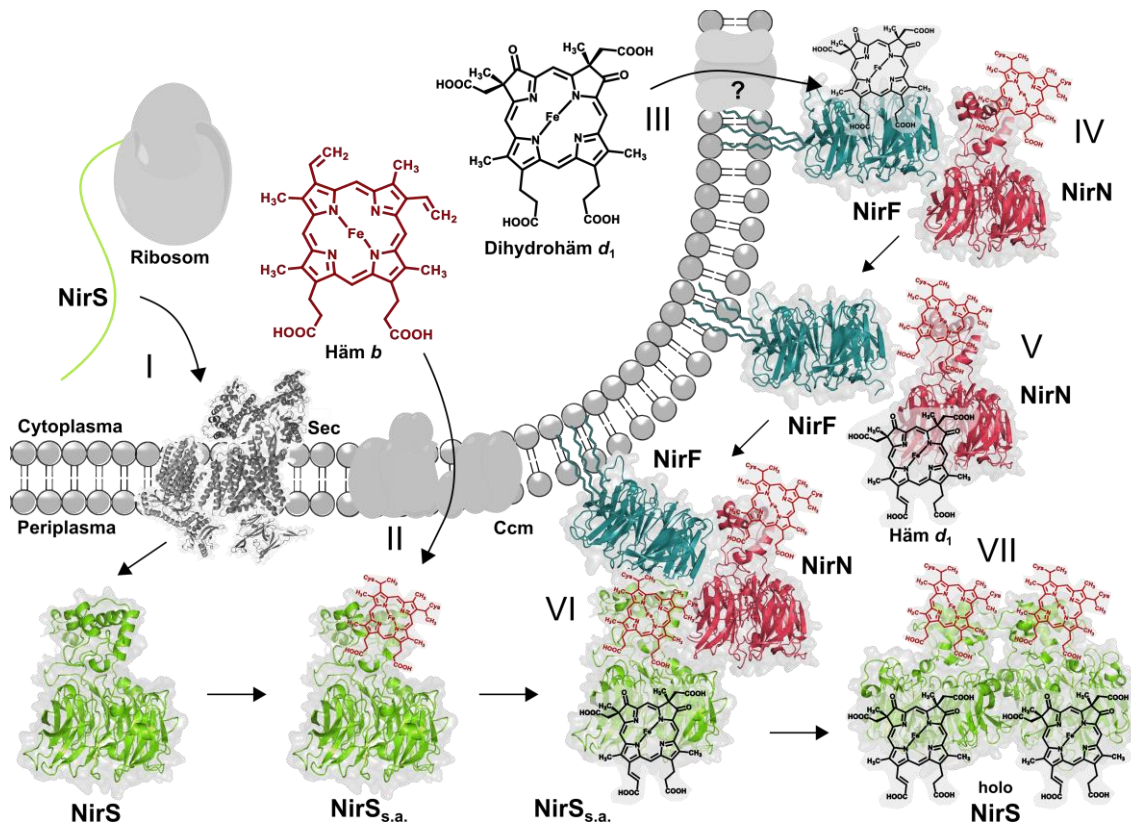


Abb. 3.21: Das Maturationsmodell der Cytochrom cd_1 Nitritreduktase in *P. aeruginosa*. I Synthese der Nitritreduktase am Ribosom und Export des ungefalteten Proteins in das Periplasma durch das Sec-System. II Häm c wird mittels der Cytochrom c Maturations Maschinerie im Periplasma kovalent mit der Nitritreduktase verknüpft, welche ihre endgültige Faltung annimmt. III Der Häm d_1 Vorläufer Dihydrohäm d_1 wird im Cytoplasma hergestellt und über einen bislang unbekannten Transporter in das Periplasma exportiert. IV Dihydrohäm d_1 wird im Periplasma von NirF entgegengenommen. V Durch die Interaktion von NirF und NirN kann Dihydrohäm d_1 auf NirN übertragen werden. NirN katalysiert die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 . VI NirF ermöglicht *in vivo* die Interaktion von NirN und NirS. Häm d_1 wird auf die Nitritreduktase übertragen. VII Die Nitritreduktase wird aktiv.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der letzte Schritt der Biosynthese des Nitritreduktase Kofaktors Häm d_1 in *P. aeruginosa* untersucht. Der biosynthetische Vorläufer von Häm d_1 , Dihydrohäm d_1 , wurde zum ersten Mal aus der nativ gereinigten Nitritreduktase NirS aus dem *P. aeruginosa* Stamm RM361 (*nirN::tet*) isoliert und charakterisiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass das periplasmatische Protein NirN die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 katalysiert, wohingegen NirF sowohl Dihydrohäm d_1 als auch Häm d_1 bindet, diese aber nicht weiter umsetzt.

Für die Isolierung von Dihydrohäm d_1 wurde zunächst ein geeignetes Produktions- und Reinigungsprotokoll für die native Nitritreduktase NirS aus dem *P. aeruginosa* Stamm RM361 etabliert. Das proteingebundene Dihydrohäm d_1 wurde mittels UV/Vis- und Resonanz-Raman Spektroskopie genauer untersucht. Zusätzlich wurde Dihydrohäm d_1 aus der gereinigten NirS extrahiert und mittels UV-Vis Spektroskopie, HPLC und Massenspektrometrie charakterisiert. Dabei wurde der Kofaktor zweifelsfrei als Dihydrohäm d_1 identifiziert. Um zu zeigen, dass NirN den letzten Schritt der Häm d_1 Biosynthese katalysiert, wurde ein Enzymaktivitätsassay mit Dihydrohäm d_1 als Substrat etabliert. NirN war dabei in der Lage, Dihydrohäm d_1 zu Häm d_1 umzusetzen. Die Durchführung des Aktivitätsassays unter anaeroben Bedingungen zeigte, dass der NirN gebundene Häm c Kofaktor während der Katalyse reduziert wird. Eine NirN Variante, die keine N-terminale Domäne und somit keinen Häm c Kofaktor enthielt, war komplett inaktiv. Mittels der Strukturmodellierung von NirN konnten verschiedene interessante Aminosäurereste identifiziert werden, deren Rolle durch Aminosäureaustausche und Charakterisierung der entsprechenden NirN Varianten untersucht wurde. So ist wahrscheinlich Y461 für die Abstraktion der Protonen der Propionaseitenkette an C17 von Dihydrohäm d_1 verantwortlich. H323 könnte das zentrale Häm Eisen des Dihydrohäm d_1 Substrats koordinieren. H417 ist möglicherweise an der Bindung des Substrats beteiligt. Mit Hilfe von Zyklovoltammetrie wurden die Redoxpotentiale des NirN gebundenen Häm c Kofaktors, sowie die von Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 bestimmt.

Das Produktions- und Reinigungsprotokoll für NirF aus *D. shibae* wurde optimiert. Es wurde außerdem mittels UV-Vis Spektroskopie gezeigt, dass NirF in der Lage

ist, Häm d_1 und Dihydrohäm d_1 zu binden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass NirF nicht in der Lage ist, Dihydrohäm d_1 umzusetzen. Durch Kristallisations-experimente konnten Kristalle von NirN und NirF erzeugt werden. Jedoch war es nicht möglich, Datensätze von den Kristallen aufzunehmen. Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnte das Maturationsmodell der Nitritreduktase NirS in *P. aeruginosa* verfeinert werden.

5 Summary

Heme d_1 is the unique cofactor of the nitrite reductase which catalyzes the second step of denitrification. This work aimed to elucidate the last enzymatic step in heme d_1 biosynthesis. The biosynthetic heme d_1 precursor, dihydroheme d_1 was isolated for the first time from the *P. aeruginosa* mutant RM361 (*nirN::tet*). It was shown that the periplasmatic protein NirN catalyzes the conversion of dihydroheme d_1 to heme d_1 . NirF binds heme d_1 as well as dihydroheme d_1 but does not convert the latter to heme d_1 .

The nitrite reductase NirS was isolated from the *P. aeruginosa* strain RM361 using a novel protocol. The NirS bound dihydroheme d_1 was characterized using UV-Vis spectroscopy as well as Resonance Raman Spectroscopy. Dihydroheme d_1 was extracted from NirS and characterized using UV-Vis spectroscopy, HPLC and massspectrometry. Using these methods, the NirS cofactor from the *P. aeruginosa* mutant RM361 could be identified as the heme d_1 precursor dihydroheme d_1 . NirN was shown to generate heme d_1 in an enzymatic activity assay using dihydroheme d_1 as a substrate. By performing the activity assay under anaerobic conditions, it was shown that the NirN bound heme c cofactor is reduced during the conversion of dihydroheme d_1 to heme d_1 . A NirN variant lacking the heme c binding domain was completely inactive. Amino acid residues potentially responsible for binding and conversion of dihydroheme d_1 were identified using structural modelling and investigated by exchanging the amino acids and characterizing the corresponding NirN variant. Y461 was identified as the amino acid residue likely involved in the abstraction of protons from the propionate side chain of dihydroheme d_1 . H323 could be the residue coordinating the central iron ion. H417 could possibly be responsible for binding of the substrate. Using protein film voltammetry, the reduction potential of the NirN bound heme c cofactor could be determined. The results suggest that NirN is an electron bifurcating dehydrogenase that forms its product in the reduced state and transfers the other electron from the reaction to its bound heme c cofactor.

Moreover, the production and purification of NirF from *D. shibae* was improved. NirF was shown to bind heme d_1 and dihydroheme d_1 . However, NirF was not able to convert dihydroheme d_1 to heme d_1 . Crystals of NirN and NirF could be obtained, yet the crystal structure of both proteins could not be solved. The model for nitrite reductase maturation could be refined using the insights gained from this work.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der letzte Schritt der Biosynthese des Nitritreduktase Kofaktors Häm d_1 untersucht. Anhand der erhaltenen Daten ließ sich folgern, dass NirN den letzten Schritt der Häm d_1 Biosynthese in *P. aeruginosa* katalysiert. Die vorliegenden Ergebnisse werfen neue Fragestellung bezüglich des Reaktionsmechanismus von NirN, sowie der Rolle von NirF in der Biosynthese und dem Transport von Dihydrohäm d_1 bzw. Häm d_1 auf. Folgende Punkte könnten in künftigen Arbeiten adressiert werden:

Charakterisierung von NirN

- Aufklärung des Reaktionsmechanismus mittels weiterer Aminosäureaustausche, Aktivitätsassays und zusätzliche EPR Studien.
- Bestimmung der kinetischen Parameter für die Umsetzung von Dihydrohäm d_1 .
- Untersuchung des intramolekularen Elektronentransfers zwischen Substrat und Häm c mittels Aminosäureaustauschen und Zyklovoltammetrie.
- Identifizierung möglicher Elektronenakzeptoren für NirN im Periplasma.
- Weitere Kristallisationsexperimente mit NirN aus *P. aeruginosa*.

Charakterisierung von NirF

- Bestimmung der Rolle von NirF für die Biosynthese oder Übertragung von Dihydrohäm d_1 durch Aminosäureaustausche und gemeinsame Aktivitätsassays mit NirJ.
- Untersuchung der Möglichkeit, dass NirF einen redoxaktiven Kofaktor enthält.
- Weitere Kristallisationsexperimente mit NirF aus *D. shibae*.

Untersuchung des Transports und der Insertion von Häm d_1

- *In vivo* Interaktionsstudien mit NirF um den Transport von Dihydrohäm d_1 über die Cytoplasmamembran aufzuklären.
- Bestimmung interessanter Aminosäurereste für die Übertragung der Kofaktoren zwischen NirF, NirN und NirS mittels Aminosäureaustausche und anschließender Übertragungsassays.

7 Literaturverzeichnis

UniProt: a hub for protein information (2015). In: *Nucleic acids research* **43**, D204-12.

Adamczack, J.; Hoffmann, M.; Papke, U.; Haufschildt, K.; Nicke, T.; Broring, M.; Sezer, M.; Weimar, R.; Kuhlmann, U.; Hildebrandt, P.; Layer, G. (2014): NirN protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a novel electron-bifurcating dehydrogenase catalyzing the last step of heme *d*₁ biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **289**, S. 30753–30762.

Adman, E. T.; Godden, J. W.; Turley, S. (1995): The structure of copper-nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes* at five pH values, with NO₂⁻ bound and with type II copper depleted. *The Journal of biological chemistry* **270**, S. 27458–27474.

Allen, J. W. A.; Barker, P. D.; Daltrop, O.; Stevens, J. M.; Tomlinson, E. J.; Sinha, N.; Sambongi, Y.; Ferguson, S. J. (2005): Why isn't 'standard' heme good enough for *c*-type and *d*₁-type cytochromes? *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **21**, S. 3410–3418.

Arai, H.; Igarashi, Y.; Kodama, T. (1995): The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et biophysica acta* **1261**, S. 279–284.

Arai, H.; Sanbongi, Y.; Igarashi, Y.; Kodama, T. (1990): Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome *c*-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS letters* **261**, S. 196–198.

Arai, H.; Mizutani, M.; Igarashi, Y. (2003): Transcriptional regulation of the *nos* genes for nitrous oxide reductase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* **149**, S. 29–36.

Arslan, E.; Schulz, H.; Zufferey, R.; Künzler, P.; Thöny-Meyer, L. (1998): Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb3* oxidase in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* **251**, S. 744–747.

Bali, S.; Lawrence, A. D.; Lobo, S. A.; Saraiva, L. M.; Golding, B. T.; Palmer, D. J.; Howard, M. J.; Ferguson, S. J.; Warren, M. J. (2011): Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and *d*₁ heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, S. 18260–18265.

Bali, S.; Warren, M. J.; Ferguson, S. J. (2010): NirF is a periplasmic protein that binds *d*₁ heme as part of its essential role in *d*₁ heme biogenesis. *The FEBS journal* **277**, S. 4944–4955.

Beale, S. I.; Gough, S. P.; Granick, S. (1975): Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, S. 2719–2723.

Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; Widdick, D.; Palmer, T.; Brunak, S. (2005): Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC bioinformatics* **6**, S. 167.

Berkmen, M., Boyd, D., Beckwith, J. (2006): Disulfide bond formation in the periplasm. *The periplasm. (Ehrmann, M., Ed.), ASM Press, Washington, DC., S. 122–140.*

Bertero, M. G.; Rothery, R. A.; Palak, M.; Hou, C.; Lim, D.; Blasco, F.; Weiner, J. H.; Strynadka, N. C. J. (2003): Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. *Nature structural biology* **10**, S. 681–687.

Besson, S.; Carneiro, C.; Moura, J. J.; Moura, I.; Fauque, G. (1995): A cytochrome *cd*₁-type nitrite reductase isolated from the marine denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: purification and characterization. *Anaerobe* **1**, S. 219–226.

Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**, S. 1513–1523.

Boer, A. P. de; Reijnders, W. N.; Kuenen, J. G.; Stouthamer, A. H.; van Spanning, R. J. (1994): Isolation, sequencing and mutational analysis of a gene cluster involved in nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**, S. 111–127.

Borrero-de Acuna, J. M.; Rohde, M.; Wissing, J.; Jansch, L.; Schobert, M.; Molinari, G.; Timmis, K. N.; Jahn, M.; Jahn, D. (2016): Protein Network of the

Pseudomonas aeruginosa Denitrification Apparatus. *Journal of bacteriology* **198**, S. 1401–1413.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, S. 248–254.

Breckau, D.; Mahlitz, E.; Sauerwald, A.; Layer, G.; Jahn, D. (2003): Oxygen-dependent coproporphyrinogen III oxidase (HemF) from *Escherichia coli* is stimulated by manganese. *The Journal of biological chemistry* **278**, S. 46625–46631.

Brindley, A. A.; Zajicek, R.; Warren, M. J.; Ferguson, S. J.; Rigby, S. E. J. (2010): NirJ, a radical SAM family member of the *d₁* heme biogenesis cluster. *FEBS letters* **584**, S. 2461–2466.

Brown, K.; Tegoni, M.; Prudencio, M.; Pereira, A. S.; Besson, S.; Moura, J. J.; Moura, I.; Cambillau, C. (2000): A novel type of catalytic copper cluster in nitrous oxide reductase. *Nature structural biology* **7**, S. 191–195.

Chang, C. K. (1994): Haem *d₁* and other haem cofactors from bacteria. *Ciba Foundation symposium* **180**, 228-38; discussion 238-46.

Chang, C. K.; Timkovich, R.; Wu, W. (1986): Evidence that heme *d₁* is a 1,3-porphyrindione. *Biochemistry* **25**, S. 8447–8453.

Chatzi, K. E.; Sardis, M. F.; Karamanou, S.; Economou, A. (2013): Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *The Biochemical journal* **449**, S. 25–37.

Choi, K.-H.; Kumar, A.; Schweizer, H. P. (2006): A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of microbiological methods* **64**, S. 391–397.

Choi, S., Spiro, T. G., Langry, K. M., and Smith, K. M. (1982): Vinyl influences on protoheme resonance Raman spectra: nickel(II) protoporphyrin IX with deuterated vinyl groups. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, S. 4337–4344.

- Choi, S., Spiro, T. G., Langry, K. M., Smith, K. M., Budd, D. L., and La Mar (1982): Structural correlations and vinyl influences in resonance Raman spectra of protoheme complexes and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, S. 4345–4351.
- Cordas, C. M.; Duarte, A. G.; Moura, J. J. G.; Moura, I. (2013): Electrochemical behaviour of bacterial nitric oxide reductase-evidence of low redox potential non-heme Fe(B) gives new perspectives on the catalytic mechanism. *Biochimica et biophysica acta* **1827**, S. 233–238.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P. (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)* **284**, S. 1318–1322.
- Cox, C. D.; Adams, P. (1985): Siderophore activity of pyoverdinin for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* **48**, S. 130–138.
- Cutruzzola, F.; Rinaldo, S.; Centola, F.; Brunori, M. (2003): NO production by *Pseudomonas aeruginosa* *cd1* nitrite reductase. *IUBMB life* **55**, S. 617–621.
- Dailey, T. A.; Dailey, H. A. (2002): Identification of 2Fe-2S clusters in microbial ferrochelatases. *Journal of bacteriology* **184**, S. 2460–2464.
- Detlefsen, D. J.; Thanabal, V.; Pecoraro, V. L.; Wagner, G. (1991): Solution structure of Fe(II) cytochrome c551 from *Pseudomonas aeruginosa* as determined by two-dimensional ¹H NMR. *Biochemistry* **30**, S. 9040–9046.
- DeVito, V., and Asher, S. A. (1989): UV resonance Raman enhancement of vinyl stretching in ferric protoporphyrin IX: conjugation and preservation of the vinyl $\pi \rightarrow \pi^*$ transition. **111**, S. 9143–9152.
- Di Matteo, A.; Gianni, S.; Schinina, M. E.; Giorgi, A.; Altieri, F.; Calosci, N.; Brunori, M.; Travaglini-Allocatelli, C. (2007): A strategic protein in cytochrome c maturation: three-dimensional structure of CcmH and binding to apocytochrome c. *The Journal of biological chemistry* **282**, S. 27012–27019.
- Dietrich, L. E. P.; Price-Whelan, A.; Petersen, A.; Whiteley, M.; Newman, D. K. (2006): The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **61**, S. 1308–1321.

- Dunn, N. W.; Holloway, B. W. (1971): Pleiotrophy of p-fluorophenylalanine-resistant and antibiotic hypersensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genetical research* **18**, S. 185–197.
- Enggist, E.; Thony-Meyer, L.; Guntert, P.; Pervushin, K. (2002): NMR structure of the heme chaperone CcmE reveals a novel functional motif. *Structure (London, England : 1993)* **10**, S. 1551–1557.
- Eschbach, M.; Schreiber, K.; Trunk, K.; Buer, J.; Jahn, D.; Schobert, M. (2004): Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of bacteriology* **186**, S. 4596–4604.
- Frankenberg, N.; Erskine, P. T.; Cooper, J. B.; Shoolingin-Jordan, P. M.; Jahn, D.; Heinz, D. W. (1999): High resolution crystal structure of a Mg²⁺-dependent porphobilinogen synthase. *Journal of molecular biology* **289**, S. 591–602.
- Gellatly, S. L.; Hancock, R. E. W. (2013): *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease* **67**, S. 159–173.
- Gershoni, J. M.; Palade, G. E. (1983): Protein blotting: principles and applications. *Analytical biochemistry* **131**, S. 1–15.
- Giwerzman, B.; Lambert, P. A.; Rosdahl, V. T.; Shand, G. H.; Hoiby, N. (1990): Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **26**, S. 247–259.
- Goddard, A. D.; Moir, J. W. B.; Richardson, D. J.; Ferguson, S. J. (2008): Interdependence of two NarK domains in a fused nitrate/nitrite transporter. *Molecular microbiology* **70**, S. 667–681.
- Gomori, G. (2010): Protein blotting: principles and applications.
- Hammes-Schiffer, S. (2015): Proton-Coupled Electron Transfer: Moving Together and Charging Forward. *Journal of the American Chemical Society* **137**, S. 8860–8871.
- Hasegawa, N.; Arai, H.; Igarashi, Y. (2001): Two c-type cytochromes, NirM and NirC, encoded in the nir gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* act as electron

donors for nitrite reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **288**, S. 1223–1230.

Haufschildt, K.; Schmelz, S.; Kriegler, T. M.; Neumann, A.; Streif, J.; Arai, H.; Heinz, D. W.; Layer, G. (2014): The crystal structure of siroheme decarboxylase in complex with iron-uroporphyrin III reveals two essential histidine residues. *Journal of molecular biology* **426**, S. 3272–3286.

Heinemann, I. U.; Jahn, M.; Jahn, D. (2008): The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **474**, S. 238–251.

Heydorn, A.; Nielsen, A. T.; Hentzer, M.; Sternberg, C.; Givskov, M.; Ersboll, B. K.; Molin, S. (2000): Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology (Reading, England)* **146 (Pt 10)**, S. 2395–2407.

Hidron, A. I.; Edwards, J. R.; Patel, J.; Horan, T. C.; Sievert, D. M.; Pollock, D. A.; Fridkin, S. K. (2008): NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection control and hospital epidemiology* **29**, S. 996–1011.

Hill, K. E.; Wharton, D. C. (1978): Reconstitution of the apoenzyme of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa* with heme *d*₁ and other heme groups. *The Journal of biological chemistry* **253**, S. 489–495.

Hino, T.; Matsumoto, Y.; Nagano, S.; Sugimoto, H.; Fukumori, Y.; Murata, T.; Iwata, S.; Shiro, Y. (2010): Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase. *Science (New York, N.Y.)* **330**, S. 1666–1670.

Hoganson, C. W.; Tommos, C. (2004): The function and characteristics of tyrosyl radical cofactors. *Biochimica et biophysica acta* **1655**, S. 116–122.

Horio, T.; Higashi, T.; Yamanaka, T.; Matsubara, H.; Okunuki, K. (1961): Purification and properties of cytochrome oxidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* **236**, S. 944–951.

Jones, R. W.; Lamont, A.; Garland, P. B. (1980): The mechanism of proton translocation driven by the respiratory nitrate reductase complex of *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* **190**, S. 79–94.

- Jungst, A.; Wakabayashi, S.; Matsubara, H.; Zumft, W. G. (1991): The nirSTBM region coding for cytochrome *cd*₁-dependent nitrite respiration of *Pseudomonas stutzeri* consists of a cluster of mono-, di-, and tetraheme proteins. *FEBS letters* **279**, S. 205–209.
- Kawasaki, S.; Arai, H.; Igarashi, Y.; Kodama, T. (1995): Sequencing and characterization of the downstream region of the genes encoding nitrite reductase and cytochrome c-551 (nirSM) from *Pseudomonas aeruginosa*: identification of the gene necessary for biosynthesis of heme *d*₁. *Gene* **167**, S. 87–91.
- Kawasaki, S.; Arai, H.; Kodama, T.; Igarashi, Y. (1997): Gene cluster for dissimilatory nitrite reductase (nir) from *Pseudomonas aeruginosa*: sequencing and identification of a locus for heme *d*₁ biosynthesis. *Journal of bacteriology* **179**, S. 235–242.
- Kelley, L. A.; Sternberg, M. J. E. (2009): Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols* **4**, S. 363–371.
- Koch, M.; Breithaupt, C.; Kiefersauer, R.; Freigang, J.; Huber, R.; Messerschmidt, A. (2004): Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *The EMBO journal* **23**, S. 1720–1728.
- Kuronen, T.; Ellfolk, N. (1972): A new purification procedure and molecular properties of *Pseudomonas* cytochrome oxidase. *Biochimica et biophysica acta* **275**, S. 308–318.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, S. 680–685.
- Lang, A.; Klinman, J. P. (2001): Quinone Cofactors. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Layer, G.; Moser, J.; Heinz, D. W.; Jahn, D.; Schubert, W.-D. (2003): Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes. *The EMBO journal* **22**, S. 6214–6224.
- Layer, G.; Reichelt, J.; Jahn, D.; Heinz, D. W. (2010): Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein science: a publication of the Protein Society* **19**, S. 1137–1161.

- Lee, D.; Pervushin, K.; Bischof, D.; Braun, M.; Thony-Meyer, L. (2005): Unusual heme-histidine bond in the active site of a chaperone. *Journal of the American Chemical Society* **127**, S. 3716–3717.
- Lee, H., Kitagawa, T., Abe, M., Pandey, R. K., Leung, H.-K., and Smith, K. M. (1986): Characterization of low frequency resonance Raman bands of metallo-protoporphyrin IX: observation of isotope shifts and normal coordinate treatments. *J. Mol. Struct.* **146**, S. 329–347.
- Lemberg, R. and Barret, J. (1972): The Cytochromes. *Academic Press, New York*.
- Li, X. Z.; Nikaido, H.; Poole, K. (1995): Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **39**, S. 1948–1953.
- Li, Y.; Bali, S.; Borg, S.; Katzmann, E.; Ferguson, S. J.; Schuler, D. (2013): Cytochrome *cd*₁ nitrite reductase NirS is involved in anaerobic magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense* and requires NirN for proper *d*₁ heme assembly. *Journal of bacteriology* **195**, S. 4297–4309.
- Londer, Y. Y. (2011): Expression of recombinant cytochromes *c* in *E. coli*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **705**, S. 123–150.
- Louie, G. V.; Brownlie, P. D.; Lambert, R.; Cooper, J. B.; Blundell, T. L.; Wood, S. P.; Malashkevich, V. N.; Hadener, A.; Warren, M. J.; Shoolingin-Jordan, P. M. (1996): The three-dimensional structure of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase at 1.76-Å resolution. *Proteins* **25**, S. 48–78.
- Mann, S. (1966): Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archiv für Mikrobiologie* **54**, S. 184–190.
- Matsuura, Y.; Takano, T.; Dickerson, R. E. (1982): Structure of cytochrome *c*₅₅₁ from *Pseudomonas aeruginosa* refined at 1.6 Å resolution and comparison of the two redox forms. *Journal of molecular biology* **156**, S. 389–409.
- May, T. B.; Shinabarger, D.; Maharaj, R.; Kato, J.; Chu, L.; DeVault, J. D.; Roychoudhury, S.; Zielinski, N. A.; Berry, A.; Rothmel, R. K. (1991): Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical microbiology reviews* **4**, S. 191–206.

- McRee, D. E. (1999): Practical protein crystallography, second edition. *Academic Press, Waltham, Massachusetts*.
- Meyer, J. M.; Neely, A.; Stintzi, A.; Georges, C.; Holder, I. A. (1996): Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* **64**, S. 518–523.
- Micklefield, J., Mackman, R. L., Aucken, C. J., Beckmann, M., Block, M. H., Leeper, F. J., Battersby, A. R. (1993): A novel stereoselective synthesis of the macrocycle of haem *d*₁ that establishes its absolute configuration as 2R,7R. *J Chem Soc, Chem Commun* **275**.
- Migula, W. (1900): System der Bakterien, zweite Edition.
- Mobius, K.; Arias-Cartin, R.; Breckau, D.; Hannig, A.-L.; Riedmann, K.; Biedendieck, R.; Schroder, S.; Becher, D.; Magalon, A.; Moser, J.; Jahn, M.; Jahn, D. (2010): Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, S. 10436–10441.
- Moura, J. J. G.; Brondino, C. D.; Trincao, J.; Romao, M. J. (2004): Mo and W bis-MGD enzymes: nitrate reductases and formate dehydrogenases. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **9**, S. 791–799.
- Mure, M. (2004): Tyrosine-derived quinone cofactors. *Accounts of chemical research* **37**, S. 131–139.
- Murphy, M. J.; Siegel, L. M.; Tove, S. R.; Kamin, H. (1974): Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, S. 612–616.
- Nicke, Tristan: Untersuchung zur Maturation der Cytochrom *cd*₁ Nitritreduktase NirS aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Braunschweig, Techn. Univ., Diss., 2013.
- Nicke, T.; Schnitzer, T.; Munch, K.; Adamczack, J.; Haufschildt, K.; Buchmeier, S.; Kucklick, M.; Felgentrager, U.; Jansch, L.; Riedel, K.; Layer, G. (2013): Maturation of the cytochrome *cd*₁ nitrite reductase NirS from *Pseudomonas*

aeruginosa requires transient interactions between the three proteins NirS, NirN and NirF. *Bioscience reports* **33**.

Nurizzo, D.; Silvestrini, M. C.; Mathieu, M.; Cutruzzola, F.; Bourgeois, D.; Fulop, V.; Hajdu, J.; Brunori, M.; Tegoni, M.; Cambillau, C. (1997): N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure (London, England : 1993)* **5**, S. 1157–1171.

Okeley, N. M.; van der Donk, W. A. (2000): Novel cofactors via post-translational modifications of enzyme active sites. *Chemistry & biology* **7**, R159-71.

Oliver, A.; Canton, R.; Campo, P.; Baquero, F.; Blazquez, J. (2000): High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science (New York, N.Y.)* **288**, S. 1251–1254.

Ouyang, N.; Gao, Y.-G.; Hu, H.-Y.; Xia, Z.-X. (2006): Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal beta-sheet and the fingerprint region. *Proteins* **65**, S. 1021–1031.

Palmer, D. J.; Schroeder, S.; Lawrence, A. D.; Deery, E.; Lobo, S. A.; Saraiva, L. M.; McLean, K. J.; Munro, A. W.; Ferguson, S. J.; Pickersgill, R. W.; Brown, D. G.; Warren, M. J. (2014): The structure, function and properties of sirohaem decarboxylase--an enzyme with structural homology to a transcription factor family that is part of the alternative haem biosynthesis pathway. *Molecular microbiology* **93**, S. 247–261.

Parr, S. R.; Barber, D.; Greenwood, C. (1976): A purification procedure for the soluble cytochrome oxidase and some other respiratory proteins from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Biochemical journal* **157**, S. 423–430.

Parthasarathi, N., Hansen, C., Yamaguchi, S., and Spiro, T. G. (1987): Metalloporphyrin core size resonance Raman marker bands revisited: implications for the interpretation of hemoglobin photoproduct Raman frequencies. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, S. 3865–3871.

Peters, J. W.; Miller, A.-F.; Jones, A. K.; King, P. W.; Adams, M. W. (2016): Electron bifurcation. *Current opinion in chemical biology* **31**, S. 146–152.

- Petersen, T. N.; Brunak, S.; Heijne, G. von; Nielsen, H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**, S. 785–786.
- Philippot, L.; Hojberg, O. (1999): Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **1446**, S. 1–23.
- Pomowski, A.; Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H.; Einsle, O. (2011): N₂O binding at a 4Cu:2S copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase. *Nature* **477**, S. 234–237.
- Potter, L.; Angove, H.; Richardson, D.; Cole, J. (2001): Nitrate reduction in the periplasm of gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* **45**, S. 51–112.
- Randall, L. L.; Crane, J. M.; Lilly, A. A.; Liu, G.; Mao, C.; Patel, C. N.; Hardy, S. J. S. (2005): Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *Journal of molecular biology* **348**, S. 479–489.
- Remans, K.; Vercammen, K.; Bodilis, J.; Cornelis, P. (2010): Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)* **156**, S. 2597–2607.
- Rhodes, G. (2006): Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models, third edition. *Academic Press, Waltham*.
- Richard-Fogal, C. L.; Frawley, E. R.; Kranz, R. G. (2008): Topology and function of CcmD in cytochrome c maturation. *Journal of bacteriology* **190**, S. 3489–3493.
- Righetti, P. G. (1990): Recent developments in electrophoretic methods. *Journal of chromatography* **516**, S. 3–22.
- Rinaldo, S.; Arcovito, A.; Giardina, G.; Castiglione, N.; Brunori, M.; Cutruzzola, F. (2008): New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa* *cdh*₁ nitrite reductase. *Biochemical Society transactions* **36**, S. 1155–1159.
- Rinaldo, S.; Brunori, M.; Cutruzzola, F. (2007): Nitrite controls the release of nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa* *cdh*₁ nitrite reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **363**, S. 662–666.

Rinaldo, S.; Giardina, G.; Castiglione, N.; Stelitano, V.; Cutruzzola, F. (2011): The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* *cdh* nitrite reductase. *Biochemical Society transactions* **39**, S. 195–200.

Sambrook, J., Russel, D. W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual, third edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*.

Sawyer, E. B.; Barker, P. D. (2012): Continued surprises in the cytochrome *c* biogenesis story. *Protein & cell* **3**, S. 405–409.

Schreiber, K.; Krieger, R.; Benkert, B.; Eschbach, M.; Arai, H.; Schobert, M.; Jahn, D. (2007): The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. *Journal of bacteriology* **189**, S. 4310–4314.

Schröter (1972): Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente. In: *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* (Cohn, F., Ed.), 109-126.

Schweizer, H. P. (2003): Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genetics and molecular research : GMR* **2**, S. 48–62.

Schweizer, H. P., Klassen, T. & Hoang, T. T. (1996): Improved methods for gene analysis and expression in *Pseudomonas*. In: *Molecular Biology of Pseudomonads* (Nakazawa, T., K., Furukawa, D. Haas and Silver, S., Ed.). *ASM Press, Washington, DC.*, S. 229–237.

Sennhauser, G.; Bukowska, M. A.; Briand, C.; Grutter, M. G. (2009): Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of molecular biology* **389**, S. 134–145.

Sharma, V.; Noriega, C. E.; Rowe, J. J. (2006): Involvement of NarK1 and NarK2 proteins in transport of nitrate and nitrite in the denitrifying bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and environmental microbiology* **72**, S. 695–701.

Shemin, D.; Russel, C. S.; Abramsky, T. (1955): The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. *The Journal of biological chemistry* **215**, S. 613–626.

Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945): The utilization of glycine for the synthesis of a porphyrin. *J. Biol. Chem.* **159**, S. 567–568.

- Shouldice, S. R.; Heras, B.; Walden, P. M.; Totsika, M.; Schembri, M. A.; Martin, J. L. (2011): Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxidants & redox signaling* **14**, S. 1729–1760.
- Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* **7**, S. 539.
- Silva, P. J.; Ramos, M. J. (2008): Comparative density functional study of models for the reaction mechanism of uroporphyrinogen III synthase. *The journal of physical chemistry. B* **112**, S. 3144–3148.
- Silvestrini, M. C.; Cutruzzola, F.; D'Alessandro, R.; Brunori, M.; Fochesato, N.; Zennaro, E. (1992): Expression of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase in *Pseudomonas putida* and characterization of the recombinant protein. *The Biochemical journal* **285 (Pt 2)**, S. 661–666.
- Silvestrini, M. C.; Cutruzzola, F.; Schinina, M. E.; Maras, B.; Rolli, G.; Brunori, M. (1996): Isolation and characterization of the d_1 domain of *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase. *Journal of inorganic biochemistry* **62**, S. 77–87.
- Silvestrini, M. C.; Falcinelli, S.; Ciabatti, I.; Cutruzzola, F.; Brunori, M. (1994): *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie* **76**, S. 641–654.
- Sofia, H. J.; Chen, G.; Hetzler, B. G.; Reyes-Spindola, J. F.; Miller, N. E. (2001): Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic acids research* **29**, S. 1097–1106.
- Spencer, J. B.; Stelowich, N. J.; Roessner, C. A.; Scott, A. I. (1993): The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS letters* **335**, S. 57–60.
- Stevens, J. M.; Daltrop, O.; Allen, J. W. A.; Ferguson, S. J. (2004): C-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Accounts of chemical research* **37**, S. 999–1007.

Stevens, J. M.; Mavridou, D. A. I.; Hamer, R.; Kritsiligkou, P.; Goddard, A. D.; Ferguson, S. J. (2011): Cytochrome *c* biogenesis System I. *The FEBS journal* **278**, S. 4170–4178.

Storbeck, S.; Rolfes, S.; Raux-Deery, E.; Warren, M. J.; Jahn, D.; Layer, G. (2010): A novel pathway for the biosynthesis of heme in Archaea: genome-based bioinformatic predictions and experimental evidence. *Archaea (Vancouver, B.C.)* **2010**, S. 175050.

Storbeck, S.; Saha, S.; Krausze, J.; Klink, B. U.; Heinz, D. W.; Layer, G. (2011): Crystal structure of the heme *d_h* biosynthesis enzyme NirE in complex with its substrate reveals new insights into the catalytic mechanism of S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferases. *The Journal of biological chemistry* **286**, S. 26754–26767.

Storbeck, S.; Walther, J.; Muller, J.; Parmar, V.; Schiebel, H. M.; Kemken, D.; Dulcks, T.; Warren, M. J.; Layer, G. (2009): The *Pseudomonas aeruginosa* nirE gene encodes the S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase required for heme *d_h* biosynthesis. *The FEBS journal* **276**, S. 5973–5982.

Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrenner, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Lagrou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, J.; Saier, M. H.; Hancock, R. E.; Lory, S.; Olson, M. V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, S. 959–964.

Studier, F. W. (2005): Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, S. 207–234.

Thoma, S.; Schobert, M. (2009): An improved *Escherichia coli* donor strain for diparental mating. *FEMS microbiology letters* **294**, S. 127–132.

Thony-Meyer, L. (2002): Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochemical Society transactions* **30**, S. 633–638.

Timkovich, R.; Cork, M. S.; Taylor, P. V. (1984): Proposed structure for the noncovalently associated heme prosthetic group of dissimilatory nitrite

- reductases. Configuration of substituents of acrylochlorin. *The Journal of biological chemistry* **259**, S. 15089–15093.
- Timoteo, C. G.; Pereira, A. S.; Martins, C. E.; Naik, S. G.; Duarte, A. G.; Moura, J. J. G.; Tavares, P.; Huynh, B. H.; Moura, I. (2011): Low-spin heme b(3) in the catalytic center of nitric oxide reductase from *Pseudomonas nautica*. *Biochemistry* **50**, S. 4251–4262.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, S. 4350–4354.
- Toyofuku, M.; Uchiyama, H.; Nomura, N. (2012): Social Behaviours under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of microbiology* **2012**, S. 405191.
- van Alst, N. E.; Sherrill, L. A.; Iglewski, B. H.; Haidaris, C. G. (2009): Compensatory periplasmic nitrate reductase activity supports anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in the absence of membrane nitrate reductase. *Canadian journal of microbiology* **55**, S. 1133–1144.
- Vander Wauven, C.; Pierard, A.; Kley-Raymann, M.; Haas, D. (1984): *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of bacteriology* **160**, S. 928–934.
- Voet, Donald; Voet, Judith G.; Pratt, Charlotte W. (2016): Fundamentals of Biochemistry. 5. Auflage. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Walsh, T. A.; Johnson, M. K.; Barber, D.; Thomson, A. J.; Greenwood, C. (1981): Studies on heme *d*₁ extracted from *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase. *Journal of inorganic biochemistry* **14**, S. 15–31.
- Wang, Y.; Ha, U.; Zeng, L.; Jin, S. (2003): Regulation of membrane permeability by a two-component regulatory system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **47**, S. 95–101.
- Warnick, G. R.; Burnham, B. F. (1971): Regulation of prophyrin biosynthesis. Purification and characterization of 5-aminolevulinic acid synthase. *The Journal of biological chemistry* **246**, S. 6880–6885.

- Warren, M. J.; Stolowich, N. J.; Santander, P. J.; Roessner, C. A.; Sowa, B. A.; Scott, A. I. (1990): Enzymatic synthesis of dihydrosirohydrochlorin (precorrin-2) and of a novel pyrrocorphin by uroporphyrinogen III methylase. *FEBS letters* **261**, S. 76–80.
- Warren, Martin; Smith, Alison (Hg.) (2010): Tetrapyrroles. Birth, Life and Death. 1st Edition. Softcover version of original hardcover edition 2009. New York, NY: Springer New York (Molecular Biology Intelligence Unit).
- Weeg-Aerssens, E.; Wu, W. S.; Ye, R. W.; Tiedje, J. M.; Chang, C. K. (1991): Purification of cytochrome *cd₁* nitrite reductase from *Pseudomonas stutzeri* JM300 and reconstitution with native and synthetic heme *d₁*. *The Journal of biological chemistry* **266**, S. 7496–7502.
- Whitby, F. G.; Phillips, J. D.; Kushner, J. P.; Hill, C. P. (1998): Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *The EMBO journal* **17**, S. 2463–2471.
- Williams, H. D.; Zlosnik, J. E. A.; Ryall, B. (2007): Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in microbial physiology* **52**, S. 1–71.
- Williams, P. A.; Fulop, V.; Garman, E. F.; Saunders, N. F.; Ferguson, S. J.; Hajdu, J. (1997): Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* **389**, S. 406–412.
- Winsor, G. L.; Lam, D. K. W.; Fleming, L.; Lo, R.; Whiteside, M. D.; Yu, N. Y.; Hancock, R. E. W.; Brinkman, F. S. L. (2011): *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic acids research* **39**, D596-600.
- Winsor, G. L.; van Rossum, T.; Lo, R.; Khaira, B.; Whiteside, M. D.; Hancock, R. E. W.; Brinkman, F. S. L. (2009): *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic acids research* **37**, D483-8.
- Xiong, J.; Bauer, C. E.; Pancholy, A. (2007): Insight into the haem *d₁* biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology (Reading, England)* **153**, S. 3548–3562.

- Yamanaka, T. (1964): Identity of *Pseudomonas* Cytochrome Oxidase with *Pseudomonas* Nitrite Reductase. *Nature* **204**, S. 253–255.
- Yamanaka, T.; Ota, A.; Okonuki, K. (1960): Nitrite reductase activity of *Pseudomonas* cytochrome oxidase. *Biochimica et biophysica acta* **44**, S. 397–398.
- Ye, R. W.; Arunakumari, A.; Averill, B. A.; Tiedje, J. M. (1992): Mutants of *Pseudomonas fluorescens* deficient in dissimilatory nitrite reduction are also altered in nitric oxide reduction. *Journal of bacteriology* **174**, S. 2560–2564.
- Zajicek, R. S.; Bali, S.; Arnold, S.; Brindley, A. A.; Warren, M. J.; Ferguson, S. J. (2009): *cd*₁ haem biogenesis - assessing the roles of three nir gene products. *The FEBS journal* **276**, S. 6399–6411.
- Zajicek, R. S.; Cartron, M. L.; Ferguson, S. J. (2006): Probing the unusual oxidation/reduction behavior of *Paracoccus pantotrophus* cytochrome *cd*₁ nitrite reductase by replacing a switchable methionine heme iron ligand with histidine. *Biochemistry* **45**, S. 11208–11216.
- Zheng, H.; Wisedchaisri, G.; Gonen, T. (2013): Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature* **497**, S. 647–651.
- Zimmermann, A.; Reimann, C.; Galimand, M.; Haas, D. (1991): Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **5**, S. 1483–1490.
- Zumft, W. G. (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **61**, S. 533–616.
- Zumft, W. G.; Kroneck, P. M. H. (2007): Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea. *Advances in microbial physiology* **52**, S. 107–227.

8 Anhang

P.aeruginosa	1	MRLIG-----LA-----LGLLLGAL-AQAGEAPGEALVROHCQACHGAGRLGSSGPTL	47
P.pantotrophus	1	--MI-----RPIAFFSL--LLALPLAVHADPAADYAEHCASCHGEDRLGGTGEPAL	46
D.shibae	1	MTPS-----RLSSSLAV--LVALTPALADPAQIYAECEAMCHGGDRLGGTGEPAL	48
B.petrii	1	MRLSTSLLLAAWLP-----S---GAALAQNAAQQLQCHCETCHGADRLLGGTGEPAL	48
P.fluorescens	1	-----MRIGWLTPLLLWIGAVHGATAPEPLALAEQNYQCHCQCHGVNRLGGAGEPAL	52
P.stutzeri	1	MQILPALLL-AAALPAATFVALDMA---SAATPDDSQALYECHCQACHGVNRLGGAGEPAL	56
B.cepacia	1	MRLIG-----LA-----LGLLLGAL-AQAGEAPGEALVROHCQACHGAGRLGSSGPTL	47
H.thermophilus	1	MKLK-----NLLLLPLLCSLSFGGGAELVLYKCYSSCHGEDRLGGHAPPL	44
M.magnetotacticum	1	-----MVVGMTVLAT-PAQAVEDAPRLVAEHCACCHGGDRLGAGEPAL	42
* : * * * * *			
P.aeruginosa	48	LFESLSRLKPAQAREVILHGRPATQMAGFAGQDDAAADALVAYLYQAPPRE-PQWTAED	106
P.pantotrophus	47	IPETLGRLRGI--DAVIAQSRVSTQMEGFADRLSPEDIAALVGYVITPLEDR-PDNGTDQ	103
D.shibae	49	IPETLSRMRGPHLHDVIAHGRATQMPGFEDVISETEIAALAEWNTPLNEI-PAMGPEQ	107
B.petrii	49	LFESLARIKRTEALQTRQGRPASQMAGFQDQVLDAAQTEALADYLYQPPATP-PTWSDAD	107
P.fluorescens	53	LPQSLRIKRPDEIRQVIENGPRPASQMAAFGAVLEPAQIDGLTRYLQRPFAVE-PTWSEDD	111
P.stutzeri	57	LFESLSRIKPAQAQAVIRQGRPASQMAAFYSHVINDAQITGLVDYLYQPSAVE-PTWSDAD	115
B.cepacia	48	LFESLSRLKPAQAREVILHGRPATQMAGFAGQDDAAADALVAYLYQAPPRE-PQWTAED	106
H.thermophilus	45	FPFFNI-PEERLYRIIEER---AVGMPSEKE-LKEEVEKQIVFIKSPVEKEKRLR	100
M.magnetotacticum	43	LFENLGRLRKAEAEVIAHGRATQMAHGDKLTPAQIKALAEVYFTPLAAV-PVMGME	101
* : * : * : * : *			
P.aeruginosa	107	IRASQVQPHPLATLPSRPFEDPLNLFVVEAGDHHVITLDGRFEPIARPSRYALHG	166
P.pantotrophus	104	IAASREMNADYQP-AEKPVFAADPLNITLVVETGDHHVSVLDGDTFEVLDRATPFVAVHG	162
D.shibae	108	IAASATMNAAGYA-APAPVWDADPLNITLVVETGDHHVSVLDGDSWDVLDRETFPFAVHG	166
B.petrii	108	IGASHRQLAPGTLPDTPQHGADPLNLFVVEAGDHHVITLDGDTFEVLDRATPFVAVHG	167
P.fluorescens	112	TRRSRRLADVASLPDKPQHADPLNLFVVEAGDHHVITLDGDRFEVLARFASHFVAVHG	171
P.stutzeri	116	IRASHRILTDVATLPTTPQHGADPLNLFVVEAGDHHVITLDGDRFEELANQSHFALHG	175
B.cepacia	107	IRASQVQPHPLATLPSRPFEDPLNLFVVEAGDHHVITLDGDRFEPIARPSRYALHG	166
H.thermophilus	101	IKGSVERV-----YTKKVEVKNLKDQYTLVVERGKNLVWVMEGERLLDFAF---SSMHG	151
M.magnetotacticum	102	IRASRVVNDPDLPSRPFQWDADPLNLFVVEAGDHHVITLDGDSFKPLARQSRFALHG	161
* : * * * * *			
P.aeruginosa	167	GPKFSPDGRFLVYFASRDGWNVTLYDLNKLKVAEVRAGLNTNRLAVSDHGRWVLVGNYLEG	226
P.pantotrophus	163	GPKFSPDGRFVYIMSRDGNVQYDIWTLAEVGRIRAAALNSRNIAISPDQRVAVANYLE	222
D.shibae	167	GPKFTPDGHRFVYFMSRDGWNVQYDLNKLKVAEVRAGLNTNRLAVSDHGRWVLVGNYLE	226
B.petrii	168	GPKFSPDGRFVYFASRDGWNISYDLNHLNLTMAEVRAGLNTNRLAVSGDGRWVLVGNYLE	227
P.fluorescens	172	GPKFSPDGRFVYFASRDGWNISYDLNHLNLTMAEVRAGLNTNRLAVSKDGRWVLVGNYLE	231
P.stutzeri	176	GPKFSPDGRFVYFASRDGWNISYDLNHLNLTMAEVRAGLNTNRLAVSNDGRWVLVGNYLE	236
B.cepacia	167	GPKFSPDGRFLVYFASRDGWNVTLYDLNKLKVAEVRAGLNTNRLAVSDHGRWVLVGNYLE	226
H.thermophilus	152	GPKFSGKEG-VAMVPSRDGWNIGYDPTK-GELKVRVACTYLRNIAFY--GGLVASCWVES	207
M.magnetotacticum	162	GAKYSPDGRFVYFASRDGWNITKDYLSLQIVAEIRAGVNTNRLAVSHDGRFVAVNYLE	221
* : * : * : * : *			
P.aeruginosa	227	NVLVDARDLSLVQVIPAADAQQAASRVSAVYTAPPRHSFVVALKDVHLEWLPYANG--	284
P.pantotrophus	223	SLTILDADLNPL-RLIE-TEVDGTPSRVSAVYQAPQRESFVIALKDAPEIWEVATAD--	277
D.shibae	227	TLTILSTEDLSVARVMDVISKGGTQSRVSAVYQAPQRESFVIALKDAPEIWEVATDPEAD	286
B.petrii	228	GLVLLDARDLSLVGSIATPLADGMPQSRVSAVYTAPPRQSFVVALKDVQVWELSYAGQ--	285
P.fluorescens	232	NVVLVDARDLSLVKTVATVGLNGQPSRVSAVYTAPPRNSFVVALKDVKEVWELSTGPN--	289
P.stutzeri	236	TLVLLDARDLSLVKHPVAVGQDGTQSRVSAVYTAPPRDSFVVALKDVKEAWELSYTGE--	293
B.cepacia	227	NVLVDARDLSLVQVIPAADAQQAASRVSAVYTAPPRHSFVVALKDVHLEWLPYANG--	284
H.thermophilus	208	RLVVFDSQLNYV-----KSEFELHGRINAVELYIRDGFIPTFKDKPLVGFVINYKDL--	258
M.magnetotacticum	222	TLVALDARDLTPLQVIPVMDGAGATQSRVSAVYTAPPRASFVVALKDAIEVWEIYPADDA	281
* : * : * : * : *			
P.aeruginosa	285	-----KPVAPKRLAVADYLDDESFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	322
P.pantotrophus	278	-----LSVRRIPIDEPLDDFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	313
D.shibae	287	PVYEGFVHSREKDMVEAIIASSGLFARRRIETAEPIDDFFTPDYRFLIGAARDGAHGVV	346
B.petrii	286	-----PDFVPRRIEADYLDDESFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	323
P.fluorescens	290	-----PDFVPRRIEADYLDDESFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	327
P.stutzeri	294	-----PTFEPRRIEADYLDDESFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	331
B.cepacia	285	-----KPVAPKRLAVADYLDDESFSFSPDYRYLLGSSRQARGGEV	322
H.thermophilus	259	-----KLTYNLGVLEDEITIDPLEEYLLGSTRSGL--ET	291
M.magnetotacticum	282	PVMNGFVHSYKGEHEGISP-GGRFQAIRIRIPDFLDDEFFDRSYERVMSASDGTGKGLV	340
* : * : * : * : *			
P.aeruginosa	323	IELDSGARVASTPLSGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	382
P.pantotrophus	314	IDLDGDKVAELPLPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	373
D.shibae	347	VNLNVGREIAKPLPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	406
B.petrii	324	IDLDGSGATIRDTALPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	383
P.fluorescens	328	IDLDMGRIVTDIPLPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	387
P.stutzeri	332	IDLDNGQAVTDIPLPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	391
B.cepacia	323	IELDSGARVASTPLSGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	382
H.thermophilus	292	YSLNDLRLVKEIKALDIPHLSAYFYWSKGDYFATELLNKPVLSVWKKAYSNEHVKDIP	351
M.magnetotacticum	341	VLDIKRKVAEIDPLPGMPLHSGGIYWKRDGRWVFATENISRGVISVLDLQNKPLKEIAT	400
* : * : * : * : *			
P.aeruginosa	383	DGPGFFMRSHADSPYAWTITFLGKKHDEILLIDKQTELAHRLRSPGKVAGHVEETRDG	442
P.pantotrophus	374	DGPGFFLRGHAASPYVWADVFFGPKDGMHVIDKNITLIVKTLAPFGQTFAHSEETRDG	433
D.shibae	407	EGPGFFLRSHENTPVVWADVFFGPKDGMHVIDKQSLIVKTLRPEPGATVAHVEETRDG	466
B.petrii	384	EGPGFFMRSHRNSPYAWTIVFFGPNDAVHLIDKQTELAHRLRMPGKNAHVEETRDG	443
P.fluorescens	388	LDPGFFLRSHVNSPYAWTIVFFGPNDAVHLIDKQTELAHRLRMPGKTAHVEETRDG	447
P.stutzeri	392	EGPGFFMRQSANSPYAWTIVFFGPNDAVHLIDKQTELAHRLRMPGKNAHVEETRDG	451
B.cepacia	383	DGPGFFMRSHADSPYAWTITFLGKKHDEILLIDKQTELAHRLRSPGKVAGHVEETRDG	442
H.thermophilus	352	DNGFLARSSYGTPIVWVDMSS---TDSMLLLDKRSLEVK-KFIPAPGRVTRVETDGD	406
M.magnetotacticum	401	LDPGFFMRSHENTGYAWTIVSGKEDATQIIDLAMEITRTRPAAGRTTAHVEETRDG	460
* : * : * : * : *			

P.aeruginosa	443	RYALLSVWDRD GALVVYDAHSLEE VKRLPMNKESGKYNVGNKIGYAE GTSH-----	493
P.pantotrophus	434	SHVLVSLWEDEGAVVVYDARTLDEVKRLPMRKESGKYNVWNKITFEDGTSH-----	484
D.shibae	467	THALVSIWEEDGAVIVYDARTLDEVKRLPMNKESGKYNVWNKITFSEGTSH-----	517
B.petrii	444	RYLLSVWDTDGALIIYDSHSLQETKRIEMNKESGKYNVGNKIEYAE GTSH-----	494
P.fluorescens	448	RYLLLSIWDTDGALIVYDSNTLKEIKRLPMNKESGKYNVGNKIEFAE GTSH-----	498
P.stutzeri	452	RYALLSVWDTDGALIVYDAKTLEE VKRIEMNKESGKYNVGNKIEFAE GTSH-----	502
B.cepacia	443	RYALLSVWDRD GALVVYDAHSLEE VKRLPMNKESGKYNVGNKIGYAE GTSH-----	493
H.thermophilus	407	RIAYVSVYEKEGALMLYDGVSLKKLGEFEANLEAGKYNEVNNKSRVFE GAQLGYQVFMEKC-----	466
M.magnetotacticum	461	RHVLSVMEAEAGELIVFDAQSFEVVRMEPMKREV GKYNVFNKINYSSGTSH-----	511
		.*: : .* :.:.*. :.: : .* . * ****. ** : .*:.	
P.aeruginosa	494	-----	493
P.pantotrophus	485	-----	484
D.shibae	518	-----	517
B.petrii	495	-----	494
P.fluorescens	499	-----	498
P.stutzeri	503	-----	502
B.cepacia	494	-----	493
H.thermophilus	467	WGCHHTTENAFGPSLRWSIQNREKALVIAQILNPENTYRLLGYSRNAMPRIELKEGELKA	526
M.magnetotacticum	512	-----	511
P.aeruginosa	494	-----	493
P.pantotrophus	485	-----	484
D.shibae	518	-----	517
B.petrii	495	-----	494
P.fluorescens	499	-----	498
P.stutzeri	503	-----	502
B.cepacia	494	-----	493
H.thermophilus	527	LMKFMEALKDGMWD	540
M.magnetotacticum	512	-----	511

Abb. 8.1: Aminosäuresequenzalignement von NirN Proteinen aus verschiedenen Organismen. Die Konservierung der Aminosäurereste ist farblich hinterlegt (von unmarkiert = nicht konserviert bis dunkelgrau hinterlegt = hoch konserviert).

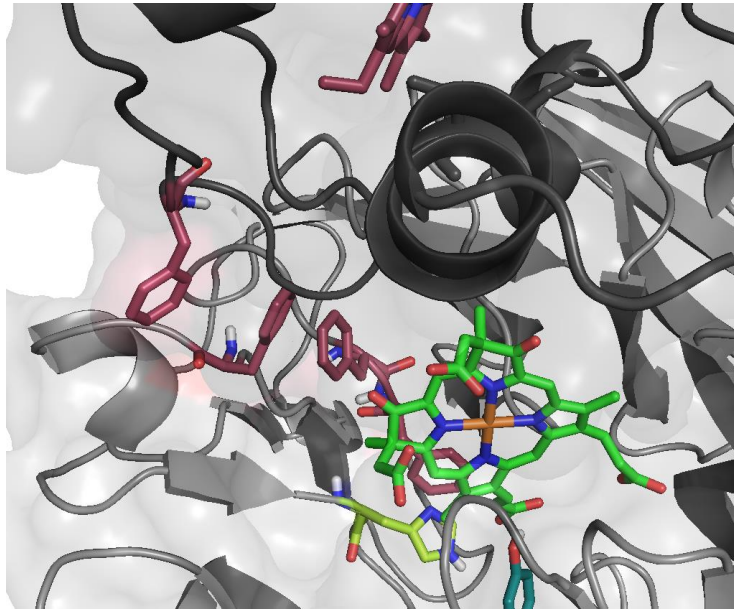


Abb 8.3: Phenylalaninreste in NirN. In rot dargestellt sind vier Phenylalaninreste in NirN (F58, F369, F370, F385), welche sich über die Distanz von der Acrylatseitenkette in Häm d_1 bis zum Häm c Kofaktor (rot, oben im Bild) erstrecken (Tyrosin 461 in blau; Histidin 417 in gelb, Häm d_1 in grün).

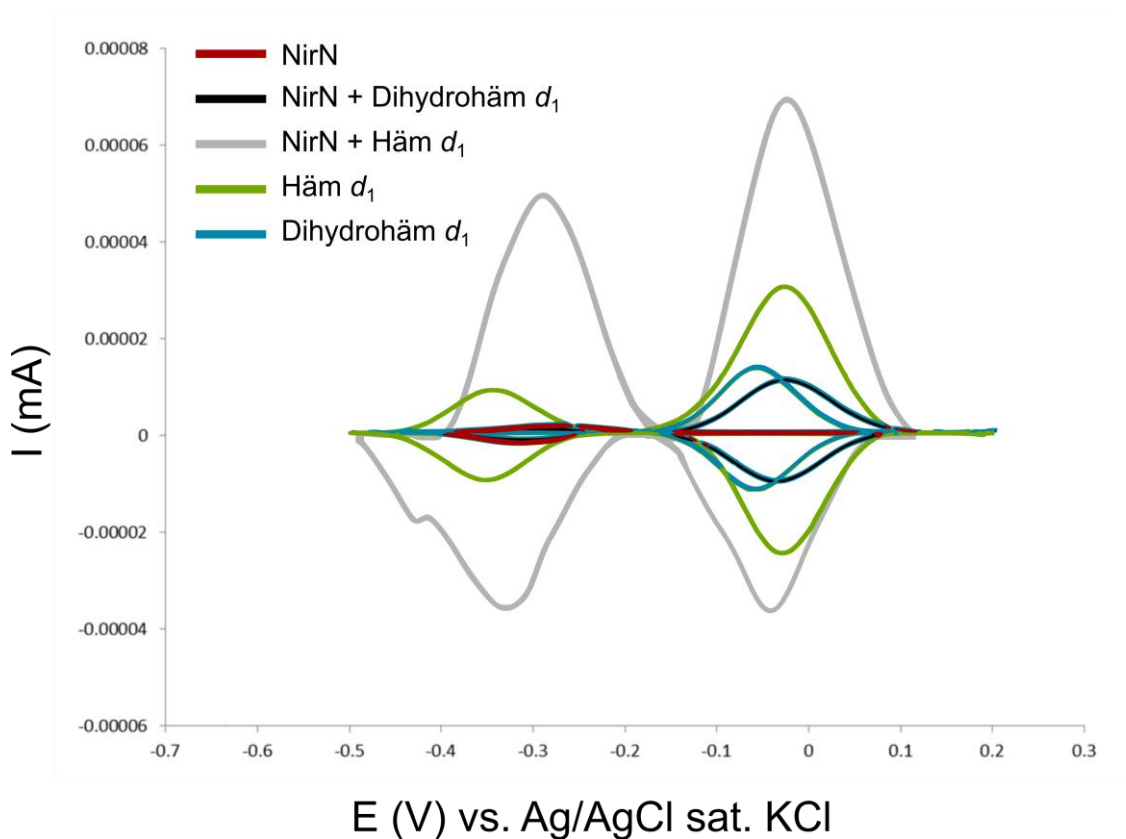


Abb. 8.4: Zyklische Voltammogramme zur Bestimmung von Redoxpotentialen. Die Basislinien substrahierten zyklischen Voltammogramme gegen die Silber/Silberchlorid Elektrode sind dargestellt. Die Messungen erfolgten in 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,2. NirN wurde äquimolar mit Häm d_1 bzw. Dihydrohäm d_1 inkubiert. Dargestellt sind die Messungen von NirN (rot), NirN mit Häm d_1 (grau) oder Dihydrohäm d_1 (schwarz), sowie freiem Häm d_1 (grün) bzw. Dihydrohäm d_1 (blau).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Dr. Gunhild “Guni“ Layer bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Thema in ihrer Gruppe zu forschen. Guni, ich danke dir für die vielen Erfahrungen, die ich bei dir sammeln konnte. Du hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, und ich freue mich, dass ich von dir lernen durfte!

Herrn Professor Dr. Dieter Jahn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Möglichkeit, dass ich Doktorand am Institut für Mikrobiologie sein durfte.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Ralf Mendel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, jedoch in erster Linie für die Möglichkeit, an der Forschergruppe “PROTRAIN“ teilnehmen zu können.

Bei der AG Layer möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen intensiven Diskussionen und die Kaffeepausen bedanken. Ich schließe mich meinen Vorrednern an: die verrückten fünf Minuten waren legendär. Tristan, danke, dass du mich so toll eingearbeitet und meine ständigen Fragen geduldig ertragen hast! Den “Pretty Little Layers“: Kristin, Mela und Linda, vielen Dank für die unvergessliche Zeit! Tobi, Katja und Marco: vielen Dank für eure Unterstützung.

Den Leipziguern: Joana, Dascha, José, Manu, Christopher und Petra: Toll, dass wir uns zusammengerauft und ein vernünftiges Labor auf die Beine gestellt haben! Danke auch, dass ihr mich so lieb aufgenommen und mir Leipzig gezeigt habt.

Vielen Dank der AG Moser, insbesondere Svenja, Janis, Maike, Christiane, Kim, Marko und Simone, für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung über all die Jahre.

Dem gesamten Institut für Mikrobiologie, insbesondere Bernd Hoppe, Christina Nitzsche und Daniela Schnobel, sowie Dagmar Rose und Barbara Cwiklinski: meinen herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kooperationspartnern danke ich für die unkomplizierte und erfolgreiche Zusammenarbeit: Professor Dr. Peter Hildebrandt und Dr. Murat Sezer für die Resonanz Raman-Messungen. Dr. Martin Hoffmann und Dr. Ulrich Papke für die Massenspektrometrie, Dr. Jörn Krausze für die Kristallisation und Dr. Louis Rosa sowie Dr. Falk Harnisch für die zyklische Voltammetrie.

Vielen lieben Dank an die GMP-Selbsthilfegruppe! Ich bin mir nicht sicher, was ich ohne euch gemacht hätte. Peggy, ich danke dir für die vielen gemeinsamen Diskussionen. Christian, danke, dass du Peggy nach Braunschweig geholt hast. Danke euch beiden für die gemeinsame Zeit.

Ulle und Susanne: Herzlichen Dank, dass ihr jederzeit für mich da wart. Ulle, danke, dass du dich unbeirrt durch diese Arbeit gekämpft hast.

Danke meinem Vater, der jetzt so stolz auf mich gewesen wäre.

Mama, du hast mir immer alles möglich gemacht! Studium, Doktorarbeit und Jobsuche: du bist immer bedingungslos für mich da, und ich kann nicht in Worte fassen, wie viel mir das bedeutet. Mumi, danke für die vielen Diskussionen, Ratschläge und deine Unterstützung. Vielen Dank, dass ihr immer an mich glaubt und mir jederzeit zur Seite steht. Danke für die Motivation und das gemeinsame Jammern. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft.

Ole, danke, dass du mich zum Weitermachen ermutigt und mich immer wieder auf den richtigen Weg gebracht hast. Danke für deine Unterstützung und für alles, was ich bisher mit dir erleben durfte. Ich freue mich auf alles, was da noch kommen mag. Annyeong!

